

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Fisiología



TESIS DOCTORAL

**Efectos del tratamiento con proantocianidinas sobre las
alteraciones vasculares producidas por la aldosterona en ratas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Olivares Álvaro

Directores

**Beatriz Martín Fernández
Natalia de las Heras Jiménez**

Madrid 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA**

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



TESIS DOCTORAL

**Efectos del tratamiento con proantocianidinas
sobre las alteraciones vasculares producidas por la
aldosterona en ratas**

Elena Olivares Álvaro

Madrid 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



Efectos del tratamiento con proantocianidinas sobre las alteraciones vasculares producidas por la aldosterona en ratas

Memoria presentada por

Elena Olivares Álvaro

Para la obtención del grado de Doctor

VºBº Directores:

Dra. Beatriz Martín Fernández

Dra. Natalia de las Heras Jiménez

Firma manuscrita en tinta azul de Dr. Vicente Lahera Juliá.

Dr. Vicente Lahera Juliá

Firma manuscrita en tinta azul de Dra. Natalia de las Heras Jiménez.

Madrid 2017

Firma manuscrita en tinta azul de Dra. Beatriz Martín Fernández.

Dña. BEATRIZ MARTÍN FERNÁNDEZ, Directora de Investigación Preclínica en
Natac Biotech S.L,

Dña. NATALIA DE LAS HERAS JIMENEZ, Profesora Contratada Doctora del
Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense
de Madrid y

D. VICENTE LAHERA JULIÁ, Catedrático del Departamento de Fisiología de la
Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN

Que Dña. Elena Olivares Álvaro ha realizado bajo su dirección los trabajos de
investigación correspondientes a su Tesis Doctoral titulada: **“Efectos del tratamiento
con proantocianidinas sobre las alteraciones vasculares producidas por la aldosterona
en ratas”**, que ha terminado con el mayor aprovechamiento y se encuentra en
condiciones para ser defendida ante un Tribunal. Para que así conste, firmamos el
presente certificado en Madrid, a 19 de Diciembre de 2017.

Dra. Beatriz Martín Fernández



Dra. Natalia de las Heras Jiménez



Dr. Vicente Lahera Juliá



Agradecimientos

“La felicidad es saber unir el final con el principio”

Pitágoras

Parece mentira que se acerque este momento, el final de esta importante etapa que me lleva a la ansiada meta doctoral. Ha sido un camino en ocasiones largo y difícil, pero en muchos momentos divertido y gratificante, pero lo mejor es, que ha sido un camino que nunca he andado en soledad. Esta tesis doctoral es fruto del trabajo de muchas personas, pero también del cariño, los ánimos y el apoyo de mucha gente. Y como todo final...no es más que un nuevo comienzo.

“Si he visto más lejos ha sido porque he subido a hombros de gigantes”

Isaac Newton

En primer lugar quiero mostrar mi agradecimiento a mis directores de tesis. A la Dra. Beatriz Martín Fernández, quien confió en mí para entrar en este grupo de investigación con lo que empezaría siendo un trabajo de fin de máster y acabaría siendo una tesis doctoral. Muchas gracias por ser mi guía a lo largo de estos años, por tu apoyo y por todo el tiempo dedicado a la consecución de este trabajo. Sin ti esta tesis doctoral no hubiese sido posible. A la Dra. Natalia de las Heras Jiménez, por tu paciencia infinita, por tu dedicación y por tus consejos tanto para este trabajo como para mi vida. Porque a lo largo de este camino no solo has sido una directora, sino mucho más. Por último, al Dr. Vicente Lahera por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral y acompañarme a lo largo de todo el camino. Tu experiencia, tu esfuerzo y tu conocimiento son un ejemplo a seguir. A todos vosotros, muchas gracias.

“Yo hago lo que tú no puedes, y tú haces lo que yo no puedo. Juntos podemos hacer grandes cosas”

Madre Teresa de Calcuta

Gracias a todas las personas que junto a mi formáis o habéis formado parte de este grupo de investigación. A Sandra, por haber sido en tantas ocasiones las manos de este trabajo. Me has acompañado y me has enseñado taaaaaaanto en estos años. Gracias por los buenos momentos que hemos pasado y por todos los ratos que has dedicado a escuchar mis moñadas. Muchas gracias Sandrita, ¡algún día acabarás dirigiendo el mundo! A Adrián, por tener esa mente brillante y por todos los consejos que me has dado. A Merche, la persona que me guio y enseñó al llegar al laboratorio. Has sido la mejor compañera que he podido tener. Me has ayudado, enseñado, consolado, divertido....TODO. Muchísimas gracias por haber estado ahí siempre. A Belén, quién ha estado conmigo mano a mano desde el principio. Para las dos llega el final de esta etapa...Muchas gracias por todos los ratitos, por las "escapadas" a cultivos y por escuchar siempre. Todo llega compañera, ¡vas a llegar lejos!

Muchas gracias también a todas esas personas que forman parte del Departamento de Fisiología, y que han formado parte de mi día a día, gracias por la acogida y el afecto. Muy especialmente a Raquel, Chula, porque eres la alegría de la huerta y tu sonrisa se contagia. Gracias por tus tantísimos consejos en el laboratorio y fuera de él. A Gema y a Rober, por todos esos ratitos de distracción que tanta falta hacen y por esos martes locosssss.

Me gustaría agradecer también a la empresa Natach Biotech S.L. y a su Director José Carlos Quintela, por habernos proporcionado el tratamiento experimental que ha sido objeto de estudio en este trabajo.

Y como no todo es ciencia, pipetas y laboratorio, me gustaría agradecer también a todas esas personas que me han ayudado a ser quien soy hoy.

"Caminante, no hay camino, se hace camino al andar"

Antonio Machado

A mis Biólogos, mis amigos. Todos ellos me han acompañado durante mis primeros años de ciencia. Muy especialmente a Edu, mi cuqui. Me has enseñado que la determinación y las ganas te pueden llevar muy lejos. Eres un ejemplo para mí en todos los sentidos. A María...mi Maricallejo. Porque no siempre lo bueno se hace esperar. Fuiste mi primera amiga en la facultad y te has convertido en un pilar fundamental. Ojalá

algún día llegue a ser la mitad de buena, válida y genial que eres tú. Vas a llegar lejísimos. Solo tienes que creerlo. A mis otras biólogas, pichoncitas, amigas. Laura y Elena. No sé qué haría sin vosotras. Llegasteis en el mejor momento y para quedaros. Habéis recorrido conmigo todos los pasos del camino. Lauri...gracias por entenderme tantísimo siempre. Elena...qué te voy a decir. Tú no eres una amiga, tú has adquirido la categoría de hermana...OROZLIVARES. Muchísimas gracias chicas.

“Los amigos: una familia cuyos individuos se eligen a voluntad”

Alphonse Karr

A mi CORTIJO...Ana, Elena, Lore, Irene, Paula y Fátima. Amistad en estado puro. Muchas gracias por todos los jueves que me habéis dado y que me dais. Os habéis convertido en una necesidad en mi semana. Gracias por haberme escuchado en whatsapp, en directo, en diferido y en todo. Gracias por aguantar mis dramas y mis tonterías. Habéis conseguido que todas las penas de los últimos años se convirtiesen en alegrías. ¡Qué de momentos hemos pasado! ¡Sois lo maaaaaaaaaaaás!

“La risa no es un mal comienzo para la amistad. Y está lejos de ser un mal final”

Oscar Wilde

A mis escolapias, Sandra, Cris, Pau y Sara, que llevan desde siempre! A mis Hienas, Bea, Cris, Ato, Lara y Paula, que demuestran día a día que por mucho que el tiempo pase hay amistades que no cambian. A Sandra y a Cris...siempre dispuestas a abrir el tarro y a regalar momentos y experiencias. A Alex, que siempre está, que es mi madrina, que me regala el ramo...que todo. A mis tatankeros...a las que ya he nombrado y a gente tan especial como Alber y Diego, verdaderos amigos. Muchas gracias a todos por acompañarme a lo largo de esta etapa.

“No le evitéis a vuestros hijos las dificultades de la vida, enseñadles más bien a superarlas”

Louis Pasteur

Por último, quiero agradecer enormemente a mi familia. Gracias Father, por todo. Por tener ese ansia de conocimiento que me has transmitido. Eres una de las

personas más sabias que conozco. Gracias mami...por ser el motor de esta familia, y por habernos sabido transmitir esa manera tan positiva de ver la vida, por que como tu bien dices "todo lo que pasa conviene" y "cuando se cierra una puerta se abre una ventana". Gracias a los dos por habernos dado siempre tanta libertad y a la vez tanta sensatez. A mis hermanos, que han sido y son un ejemplo para mí, un referente a seguir y una sensación de hogar. Gracias Jorge, por ser la guasa de la casa y por saber sacarnos una risa cuando sea. Sigue siendo siempre tan generoso y tan buen hermano. Por último a mi hermana Ana, quien no solo es hermana sino que también es amiga y consejera. Eres un ejemplo de que con constancia, voluntad y ganas de puede llegar lejísimos. Y llegarás. Gracias a los cuatro porque sin vosotros este trabajo no hubiese sido posible. Me habéis animado y empujado en los malos momentos y acompañado en los buenos. Sois la mejor familia que se puede tener, y me siento muy afortunada de que seáis la mía.

"A quien amas, dale alas para volar, raíces para volver y motivos para quedarse"

Dalai Lama

Gracias Jorge, por todo. Por estar incondicionalmente y por hacerme feliz todos los días. Por apoyarme y animarme siempre. Por ser mi compañero. Aquí, allí o donde sea.

“El modo de dar una vez en el clavo,

Es dar cien veces en la herradura”

Miguel de Unamuno.

Abreviaturas

• O₂⁻ : Anión superóxido	CYP11A1 : Aldosterona sintetasa
11-β-HSD2 : 11β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa tipo 2	DAG : Diacilglicerol
αENaC : Subunidad α del canal epitelial de sodio	DOC : 11-deoxicorticosticosterona
AI : Angiotensina I	DRP1 : Proteína relacionada con la dinamina 1
AI : Angiotensina II	ECA : Enzima convertidora de angiotensina
AC : Adenilato ciclasa	ECV : Enfermedad cardiovascular
ACh : Acetilcolina	EGFR : Receptor de factor de crecimiento epidérmico
ACTH : Hormona adrenocorticotropa	ENaC : Canal epitelial de sodio
ADNmt : ADN mitocondrial	eNOS : Óxido nítrico sintasa endotelial
Akt : Proteína quinasa B	ERK : Quinasa regulada por señales extracelulares
ALDO : Grupo aldosterona	EROs : Especies reactivas de oxígeno
AMPc : Adenosín monofosfato cíclico	FE : Fenilefrina
ANOVA : Test estadístico de análisis de la varianza	FIS1 : Proteína de fisión 1
ATP : Adenosín monofosfato tricíclico	γENaC : Subunidad γ del canal epitelial de sodio
βENaC : Subunidad β del canal epitelial de sodio	GAPDH : Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
BH₄ : Tetrahidrobiopterina	GMPc : Guanosín monofosfato cíclico
BSA : Albúmina de suero bovino	GP : Receptor de estrógenos acoplado a proteínas G
c-Src : Tirosín quinasa citosólica	GTP : Guanosín trifosfato
CAMKs : Calcio calmodulinas quinasas	HDL : Lipoproteínas de alta densidad
CE : Células endoteliales	ICAM-1 : Molécula de adhesión intercelular 1
CHIF : Factor inductor de la hormona corticosteroide	IECA : Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
CMLV : Células de músculo liso vascular	IL-1β : Interleuquina 1β
CONTROL : Grupo control	IL-6 : Interleuquina 6
CTGF : Factor de crecimiento de tejido conectivo	IP₃ : Inositol trifosfato

KCl: Cloruro potásico

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

MANOVA: Análisis multivariable de la varianza para medidas repetidas

MAPK: Quinasa activada por mitógeno

MEC: Matriz extracelular

MFN: Mitofusina

MMPs: Metaloproteasas de matriz

NaCl: Cloruro sódico

NADPHox: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa

Na⁺/K⁺ ATPasa: Bomba de sodio-potasio dependiente de ATP

Nedd4-2: Ubiquitina ligasa E3

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B

NO: Óxido nítrico

NRF: Factor respiratorio nuclear

OMA1: Metaloproteasa mitocondrial 1

ONOO⁻: Peroxinitrito

OPA1: Proteína de atrofia óptica 1

p22phox: Subunidad p22phox de la NADPH oxidasa

P80: Extracto de proantocianidias al 80% de riqueza

PAS: Presión arterial sistólica

PAD: Presión arterial diastólica

PARKIN: Ubiquitina ligasa PARKIN

p-eNOS^{Ser1177}: Fosforilación de la eNOS en el residuo de Serina 1177

PGC1 α : Coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferación de peroxisomas

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa

PINK1: Quinasa inducida por PTEN 1

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PKD: Proteína quinasa D

PNA: Péptido natriurético auricular

pNedd4-2: Forma fosforilada de Nedd4-2

POCs: Proantocianidinas oligoméricas

PPARs: Peroxisoma proliferador activado del receptor

PPCs: Proantocinidinas poliméricas

RM: Receptor de mineralocorticoides

ROMK: Canal de potasio medular exterior renal

SDS: Dodecilsulfato sódico

SGK1: Quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1

SIRT1: Sirtuina 1

SOD: Superóxido dismutasa

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

StAR: Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda

TFAM: Factor de transcripción mitocondrial A

TGF β : Factor de crecimiento transformante β

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

Yme1l: Proteasa dependiente de ATP Yme1l

Índice

RESUMEN **21**

- 1. RESUMEN** **23**
- 2. SUMMARY** **27**

INTRODUCCIÓN **31**

- 1. LA PARED ARTERIAL** **33**
- 2. ALDOSTERONA** **36**
 - 2.1. Biosíntesis de la aldosterona. **36**
 - 2.2. Síntesis endógena de aldosterona. **39**
 - 2.3. Metabolismo de la aldosterona. **39**
 - 2.4. Mecanismo de acción de la aldosterona. **40**
 - 2.5. Acciones de la aldosterona. **41**
 - 2.5.1. Acciones genómicas de la aldosterona. **41**
 - 2.5.2. Mediadores implicados en el transporte de sodio: SGK1, ENaC y Nedd4-2.
 - 2.5.3. Acciones no genómicas de la aldosterona. **48**
 - 2.6. Regulación de la secreción de aldosterona. **49**
 - 2.6.1. Angiotensina II. **49**
 - 2.6.2. Hormona adrenocorticotropa. **50**
 - 2.6.3. Niveles plasmáticos de sodio. **51**
 - 2.6.4. Niveles plasmáticos de potasio. **51**
 - 2.6.5. Péptido natriurético auricular. **52**
 - 2.7. Hiperaldosteronismo. **52**
 - 2.7.1. Hiperaldosteronismo primario o síndrome de Conn. **53**
 - 2.7.2. Hiperaldosteronismo secundario. **53**

3. ALTERACIONES VASCULARES ASOCIADAS AL EXCESO DE ALDOSTERONA	54
3.1. Alteraciones estructurales.	54
3.1.1. Remodelado de la pared arterial.	54
3.2. Alteraciones funcionales.	57
3.2.1. Hipertensión arterial.	57
3.2.2. Disfunción endotelial.	59
3.3. Alteraciones moleculares.	61
3.3.1. Inflamación.	61
3.3.2. Fibrosis.	63
3.3.3. Oxidación.	64
4. FISIOLÓGÍA DE LA MITOCONDRIA	72
4.1. Estructura de la mitocondria.	72
4.2. Dinámica mitocondrial.	73
4.2.1. Biogénesis mitocondrial.	74
4.2.2. Fusión y fisión mitocondrial.	76
4.2.3. Mitofagia.	79
4.3. Disfunción mitocondrial.	81
5. ANTIOXIDANTES NATURALES	83
5.1. Estructura de los polifenoles.	83
5.2. Clasificación de los polifenoles.	84
5.2.1. Flavonoides.	85
5.2.2. Proantocianidinas.	85
Efectos de las proantocianidinas.	87
Mecanismo de acción de las proantocianidinas.	89
Bloqueo del receptor de mineralocorticoides.	89
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	91
1. HIPÓTESIS	93
2. OBJETIVOS	94

MATERIAL Y MÉTODOS 95

1. MODELO EXPERIMENTAL	97
2. METODOLOGÍA	98
2.1. Medida de la presión arterial sistólica.	98
2.2. Extracción, preparación y conservación de las muestras.	99
2.3. Reactividad vascular en anillos de aorta.	100
2.3.1. Estudio de la respuesta vasoconstrictora.	102
2.3.2. Estudio de la respuesta vasodilatadora.	103
2.4. Estudio histológico de la aorta.	103
2.4.1. Morfometría de la aorta.	103
2.4.2. Contenido de colágeno en la aorta.	104
2.5. Expresión proteica en aorta mediante western blot.	105
2.5.1. Preparación de las muestras.	105
2.5.2. Cuantificación de proteínas.	105
2.5.3. Electroforesis de proteínas.	106
2.5.4. Transferencia de proteínas.	106
2.5.5. Inmunodetección de proteínas.	107
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	110

RESULTADOS 113

1. Efecto del tratamiento con P80 sobre la presión arterial sistólica en ratas a las que se les administró aldosterona.	115
2. Efecto del tratamiento con P80 sobre la reactividad vascular en anillos de aorta de ratas a las que se les administró aldosterona.	116
2.1. Respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio.	116
2.2. Respuesta vasoconstrictora independiente de endotelio.	117
3. Efecto del tratamiento con P80 sobre las alteraciones estructurales vasculares en ratas a las que se les administró aldosterona.	120
3.1. Análisis morfológico.	120

3.2	Contenido de colágeno de la aorta.	122
3.3.	Expresión proteica del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF).	124
4.	Efecto del tratamiento con P80 sobre la inflamación, la oxidación y la eNOS vascular en ratas a las que se les administró aldosterona.	125
4.1.	Inflamación: expresión proteica del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).	125
4.2.	Oxidación: expresión proteica de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa (p22phox).	126
4.3.	Expresión proteica de la óxido nítrico sintasa endotelial y su fosforilación en el residuo de serina 1177 (eNOS y p-eNOS ^{Ser1177}).	126
5.	Efecto del tratamiento con P80 sobre los mediadores implicados en el transporte de sodio vascular en ratas a las que se les administró aldosterona.	128
5.1.	Expresión proteica de la quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1 (SGK1).	128
5.2.	Expresión proteica de las tres subunidades (α , β y γ) del canal epitelial de sodio (ENaC) .	129
5.3.	Expresión proteica de la ubiquitina ligasa E3 y su forma fosforilada (Nedd4-2 y pNedd4-2).	131
6.	Efecto del tratamiento con P80 sobre las alteraciones mitocondriales vasculares en ratas a las que se les administró aldosterona.	132
6.1.	Biogénesis mitocondrial.	132
6.1.1.	Expresión proteica de la sirtuína-1 (SIRT1).	132
6.1.2.	Expresión proteica del coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferación de peroxisomas (PGC1 α).	133
6.1.3.	Expresión proteica del factor respiratorio nuclear 1 (NRF1).	133
6.1.4.	Expresión proteica del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM).	134
6.2.	Remodelado mitocondrial (fusión / fisión).	135

6.2.1. Expresión proteica de la metaloentopeptidasa mitocondrial 1 (OMA1).	135
6.2.2. Expresión proteica de la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1).	136
6.2.3. Expresión proteica de la proteína relacionada con la dinamina 1 (DRP1).	137
6.2.4. Expresión proteica de la mitofusina 1 (MFN1).	138
6.3. Mitofagia.	139
6.3.1. Expresión proteica de la quinasa inducida por PTEN 1 (PINK1).	139
6.4. Estado oxidativo mitocondrial.	140
6.4.1. Expresión proteica de la superóxido dismutasa 2 (SOD2).	140

DISCUSIÓN **143**

1. Efectos del tratamiento con proantocianidinas sobre las alteraciones vasculares producidas por la aldosterona en ratas. **145**

1.1. El tratamiento con proantocianidinas previene el desarrollo de hipertensión y mejora las alteraciones de la función vascular producidas por la aldosterona.	145
1.2. El tratamiento con proantocianidinas mejora las alteraciones sobre el remodelado de la pared vascular y la fibrosis producidas por la aldosterona.	148
1.3. El tratamiento con proantocianidinas mejora la inflamación y la oxidación vascular, estimuladas por la aldosterona.	150

2. Efectos del tratamiento con proantocianidinas sobre las alteraciones en la expresión proteica vascular de SGK1, ENaC y Nedd4-2 producidas por la aldosterona en ratas. **157**

2.1 La administración de aldosterona aumenta la expresión vascular de los mediadores implicados en el transporte de sodio.	157
2.2. El tratamiento con proantocianidinas disminuye la expresión de los mediadores implicados en el transporte de sodio vascular.	163

3. Efecto del tratamiento con proantocianidinas sobre las alteraciones mitocondriales vasculares producidas por la aldosterona en ratas.	166
3.1. La administración de aldosterona altera la expresión de los mediadores implicados en el proceso de biogénesis mitocondrial vascular.	166
3.2. El tratamiento con proantocianidinas regula la expresión de los mediadores implicados en el proceso de biogénesis mitocondrial vascular tras la administración de aldosterona.	170
3.3. La administración de aldosterona altera la expresión de los mediadores implicados en el proceso de remodelado mitocondrial vascular.	172
3.4. El tratamiento con proantocianidinas modula la expresión de los mediadores implicados en el proceso de remodelado mitocondrial vascular, alterada tras la administración de aldosterona.	176
3.5. La administración de aldosterona disminuye la expresión del mediador de mitofagia PINK1.	178
3.6. El tratamiento con proantocianidinas aumenta la expresión del mediador de mitofagia PINK1 tras la administración de aldosterona.	180
3.7. La administración de aldosterona altera la respuesta antioxidante mitocondrial.	181
3.8. El tratamiento con proantocianidinas mejora la respuesta antioxidante mitocondrial tras la administración de aldosterona.	182
RESUMEN Y CONCLUSIONES	185
7. RESUMEN DE RESULTADOS	187
8. CONCLUSIONES	188
BIBLIOGRAFÍA	189



Resumen

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El exceso de aldosterona produce alteraciones vasculares como remodelado vascular, disfunción endotelial, inflamación y estrés oxidativo a través de diferentes mecanismos. En estudios previos de nuestro grupo de investigación se observó que las proantocianidinas ejercían efectos beneficiosos en el corazón de ratas con hiperaldosteronismo. Así mismo, el tratamiento con proantocianidinas disminuyó la expresión del mediador de las acciones de la aldosterona SGK1, sugiriendo que las proantocianidinas podrían actuar bloqueando el receptor de mineralocorticoides. SGK1 modula la acción de transportadores de sodio a la célula, como ENaC y Nedd4-2, a nivel renal y cardiaco, entre otros. Por otro lado, el transporte de sodio a través de la pared vascular, juega un papel importante en situaciones patológicas, como la hipertensión y el remodelado vascular. Por esta razón, se planteó estudiar los efectos del tratamiento con proantocianidinas sobre la expresión de los mediadores implicados en la entrada de sodio en aorta de ratas con hiperaldosteronismo.

Las mitocondrias son orgánulos fundamentales en la vía de producción de energía, la fosforilación oxidativa, la cual está relacionada con la generación del subproducto anión superóxido. Bajo condiciones de estrés, como podría ser el hiperaldosteronismo, la cadena respiratoria de electrones se convierte en una importante fuente de estrés oxidativo. Estudios previos han demostrado que un exceso de aldosterona produce disfunción mitocondrial en células epiteliales glomerulares a través del RM. A su vez, se ha puesto de manifiesto que el uso de antagonistas del

receptor de mineralocorticoides como la eplerenona previenen el daño mitocondrial inducido por la aldosterona. Por esta razón, nos planteamos estudiar el efecto del tratamiento con proantocianidinas sobre las alteraciones vasculares en los procesos de la dinámica mitocondrial inducidas por la administración de aldosterona en ratas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar el estudio se utilizaron 32 ratas macho Wistar distribuidas en 4 grupos (n=8): CONTROL: ratas que recibieron una inyección subcutánea con el vehículo (aceite de girasol); ALDO: ratas que recibieron una inyección subcutánea diaria de 1,5 mg/kg/día de aldosterona (suspendida en aceite de girasol) más 1% NaCl en el agua de bebida; P80: ratas tratadas con un extracto de arándano rojo al 80% de riqueza en proantocianidinas (5mg/kg/día de extracto el agua de bebida) y ALDO+P80: ratas tratadas con aldosterona y proantocianidinas a las dosis mencionadas. El periodo de evolución fue de 21 días.

Se midió la presión arterial sistólica al comienzo y al final del tratamiento. Tras sacrificar a los animales, se extrajo la aorta torácica y se valoraron los siguientes parámetros: a) reactividad vascular en anillos de aorta, b) morfometría y contenido de colágeno de la aorta a través de estudios histológicos y c) expresión proteica mediante western blot de marcadores de fibrosis (CTGF), inflamación (TNF α), oxidación (subunidad p22phox de la NADPHox, eNOS y p-eNOS^{Ser1177}), mediadores implicados en el transporte de sodio (SGK1, ENaC, Nedd4-2 y pNedd4-2). También se valoró la expresión vascular de mediadores implicados en los procesos de biogénesis

mitocondrial (SIRT1, PGC1 α , NRF1 y TFAM), fusión y fisión mitocondrial (DRP1, MFN1, OMA1 y OPA1) y mitofagia (PINK1).

RESULTADOS

En el grupo ALDO los niveles de la presión arterial sistólica y la respuesta vasoconstrictora a AII aumentaron con respecto al grupo CONTROL ($p<0,05$) y disminuyeron en el grupo ALDO+P80 con respecto al grupo ALDO ($p<0,05$). La respuesta vasoconstrictora a KCl fue comparable en todos los grupos experimentales. La respuesta vasoconstrictora a AI y PE fue comparable entre los grupos ALDO y CONTROL, sin embargo, se observó una disminución de la misma en el grupo ALDO+P80 en comparación con el grupo ALDO ($p<0,05$). A su vez, se observó una respuesta vasodilatadora reducida frente a dosis intermedias de ACh en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL ($p<0,05$), observándose un aumento de la misma en el grupo ALDO+P80 en comparación con el grupo ALDO ($p<0,05$). Del mismo modo, el contenido de colágeno, el área de la lámina media y la expresión proteica de CTGF, TNF α y de la subunidad p22phox aumentaron en el grupo ALDO en comparación con el grupo CONTROL ($p<0,05$) y disminuyeron en el grupo ALDO+P80 con respecto al grupo ALDO ($p<0,05$). La expresión proteica de SGK1, de las tres subunidades α , β y γ de ENaC y de pNedd4-2 aumentó en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL ($p<0,05$) y disminuyó en el grupo ALDO+P80 en comparación con el grupo ALDO ($p<0,05$). En el grupo ALDO disminuyó la expresión de eNOS, p-eNOS^{Ser1177} y Nedd4-2 con respecto al grupo CONTROL ($p<0,05$), aumentando en el grupo ALDO+P80 en comparación con el grupo ALDO ($p<0,05$). En cuanto a los marcadores de la dinámica mitocondrial, se

observó una disminución de la expresión proteica en aorta de PGC1 α , SIRT1, TFAM, L-OPA1, MFN1 y PINK1 en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL ($p<0,05$), observándose el aumento de la expresión de dichos parámetros en el grupo ALDO+P80 en comparación con el grupo ALDO ($p<0,05$). Por otro lado, la expresión vascular de S-OPA1, DRP1 y OMA1 aumentó en el grupo ALDO en comparación con el grupo CONTROL ($p<0,05$), observándose una disminución de los mismos en el grupo ALDO+P80 con respecto al grupo ALDO ($p<0,05$).

CONCLUSIONES

El tratamiento con proantocianidinas fue capaz de prevenir las alteraciones producidas por la administración de aldosterona sobre la expresión proteica en aorta de los mediadores implicados en el transporte de sodio celular. Este efecto podría relacionarse con la mejora de las alteraciones estructurales, funcionales y moleculares observadas en el grupo ALDO+P80 en comparación con el grupo ALDO. A su vez, el tratamiento con proantocianidinas previno los cambios producidos por la aldosterona sobre la expresión de los mediadores implicados en los procesos de la dinámica mitocondrial a nivel vascular. Los presentes resultados, junto con resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo de investigación, sugieren que el tratamiento con proantocianidinas podría estar ejerciendo sus efectos beneficiosos a nivel vascular a través del bloqueo del receptor de mineralocorticoides. Por tanto, las proantocianidinas podrían constituir una alternativa terapéutica a los antagonistas clásicos del receptor de mineralocorticoides para la prevención y el tratamiento de las alteraciones vasculares asociadas al hiperaldosteronismo.

2. SUMMARY

INTRODUCTION

Aldosterone excess induces vascular alterations such as vascular remodelling, endothelial dysfunction, inflammation and oxidative stress through several mechanisms. Previous studies from our research group showed cardioprotective effects of proanthocyanidins in rats with experimental hyperaldosteronism. Treatment with proanthocyanidins downregulated the cardiac expression of SGK1, considered one of the main aldosterone intracellular mediators, suggesting a mineralocorticoid receptor antagonism. SGK1 regulates sodium exchangers such as ENaC and Nedd4-2, in kidney and heart in response to aldosterone. On the other hand, sodium transport in the vascular wall plays a central role in the development of vascular alterations such as hypertension and vascular remodeling. Following this line of research, in the present study, we aimed to explore proanthocyanidins effect on protein expression of intracellular mediators involved in sodium transport in the aortic wall of rats with hyperaldosteronism.

Mitochondria are essential organelles in the energy production system, the oxidative phosphorylation, which is also related to the generation of free radicals such as superoxide anion. Under stress conditions, such as aldosterone excess, the oxidative phosphorylation system releases an excess of free radicals, inducing oxidative stress. Previous studies showed that aldosterone excess induces mitochondrial dysfunction in glomerular epithelial cells through the mineralocorticoid receptor. Additionally, it has been demonstrated that mineralocorticoid receptor antagonists, such as eplerenone,

are able to prevent mitochondrial damage caused by aldosterone excess. Therefore, we aimed to study the proanthocyanidins effect on protein expression of mediators related with mitochondrial dynamics in the aorta of rats with experimental hyperaldosteronism.

METHODS

The study was conducted in 32 male Wistar rats, distributed in 4 groups (n=8): CONTROL, rats receiving a daily subcutaneous injection of the vehicle, (sunflower oil); ALDO: rats receiving a daily subcutaneous injection of 1,5 mg/kg/day of aldosterone dissolved in vehicle plus 1% NaCl as drinking water; P80: rats treated with a red cranberry extract (80% w/w, 5 mg/kg/day of extract as drinking water) and ALDO+P80: rats treated with aldosterone plus proanthocyanidins at the indicated doses. The treatment period was 3 weeks. Systolic blood pressure was measured at the beginning and at the end of the experimental period and the following parameters were evaluated: a) vascular reactivity in aorta, b) morphometry and collagen content in aorta by histological studies and c) protein expression of the following proteins by western blot: fibrosis (CTGF), inflammation (TNF α), oxidative stress (p22phox subunit of NADPHox, eNOS and p-eNOS^{Ser1177}), and sodium transport exchangers (SGK1, ENaC, Nedd4-2 and pNedd4-2). The vascular protein expression of mediators related with the processes of mitochondrial biogenesis (SIRT1, PGC1 α , NRF1 and TFAM), mitochondrial fusion and fission (DRP1, MFN1, OMA1 and OPA1) and mitophagy (PINK1) were also measured.

RESULTS

Systolic blood pressure and vasoconstrictor response to AI increased in ALDO group compared to CONTROL group ($p<0,05$) and decreased in ALDO+P80 group compared to ALDO group ($p<0,05$). Contractile response to KCl was comparable in all experimental groups. Contractile response to AI and PE was comparable in ALDO group and in CONTROL group, however, it was decreased in ALDO+P80 group compared with ALDO group ($p<0,05$). Additionally, vasodilator response to ACh decreased in ALDO group when compared to CONTROL group ($p<0,05$), and increased in ALDO+P80 group compared to ALDO group ($p<0,05$). Similarly, collagen content, lamina media area and protein expression of CTGF, TNF α and p22phox subunit were higher in ALDO group compared to CONTROL group ($p<0,05$) and lower in ALDO+P80 compared with ALDO group ($p<0,05$). In ALDO group, protein expression levels of SGK1, α ENaC, β ENaC, γ ENaC and pNedd4-2 increased compared to CONTROL group ($p<0,05$) and decreased in ALDO+P80 group compared with ALDO group ($p<0,05$). Protein expression levels of eNOS, p-eNOS^{Ser1177} and Nedd4-2 were lower in ALDO group compared to CONTROL group ($p<0,05$), and higher in ALDO+P80 group compared to ALDO group ($p<0,05$). Concerning the mitochondrial dynamics mediators, protein expression in aorta of PGC1 α , SIRT1, TFAM, L-OPA1, MFN1 and PINK1 decreased in ALDO group compared to CONTROL group ($p<0,05$), and increased in ALDO+P80 compared with ALDO group ($p<0,05$). Vascular expression of S-OPA1, DRP1 and OMA1 increased in ALDO group compared with CONTROL ($p<0,05$), and increased in ALDO+P80 group compared with ALDO group ($p<0,05$).

CONCLUSIONS

Treatment with proanthocyanidins prevented the alterations induced by aldosterone excess in aorta protein expression of sodium transport mediators. This effect could be related to the vascular structural, functional and molecular improvement observed in ALDO+P80 compared to ALDO group. In addition, treatment with proanthocyanidins prevented the changes induced by aldosterone in the protein levels of the mediators related to the vascular mitochondrial dynamics processes. The results obtained in the present study, together with those previously found, further support the concept that proanthocyanidins could exert their vascular beneficial effects through mineralocorticoid receptor antagonism. Consequently it could be proposed that, proanthocyanidins might be considered as an alternative therapeutical approach of classical mineralocorticoid receptor antagonists for the prevention and treatment of vascular pathologies related to aldosterone excess.



Introducción



1. LA PARED ARTERIAL

La pared arterial está compuesta por el endotelio, las células de músculo liso vascular (CMLV) y los fibroblastos, que interaccionan entre sí formando un complejo autocrino-paracrino. Se divide en tres láminas concéntricas bien diferenciadas morfológicamente: la lámina íntima, la lámina media y la lámina adventicia, separadas entre sí por una lámina elástica interna y una lámina elástica externa (1-3).

La **lámina íntima** está constituida por una monocapa de células endoteliales (CE) en contacto con la circulación sanguínea y que recubre una membrana basal y una capa conjuntiva subendotelial formada por fibras de colágeno, fibras elásticas y CMLV. El endotelio no constituye solamente una monocapa de células inertes, sino que desempeña un papel fundamental en la fisiología y en la fisiopatología vascular, regulando la vasoconstricción y la vasodilatación e inhibiendo y estimulando la proliferación de las CMLV así como la migración y adhesión de leucocitos (4, 5).

La **lámina media**, es la capa más gruesa y regula el tono vasomotor. Contiene CMLV dispuestas de forma concéntrica, y embebidas en una compleja matriz extracelular compuesta por fibras de colágeno y elastina. Las fibras de colágeno presentes en la capa media presentan también una disposición concéntrica y son principalmente de los tipos I, III y V.

La **lámina adventicia** es la capa externa y está formada principalmente por fibras de colágeno, elastina y fibroblastos. La adventicia forma una malla poco definida de fibras de colágeno que se mezclan formando el tejido conectivo, en el que se distribuyen las fibras elásticas y los pequeños vasos nutricios (*vasa vasorum*) que irrigan las células de la pared arterial (Figura 1).

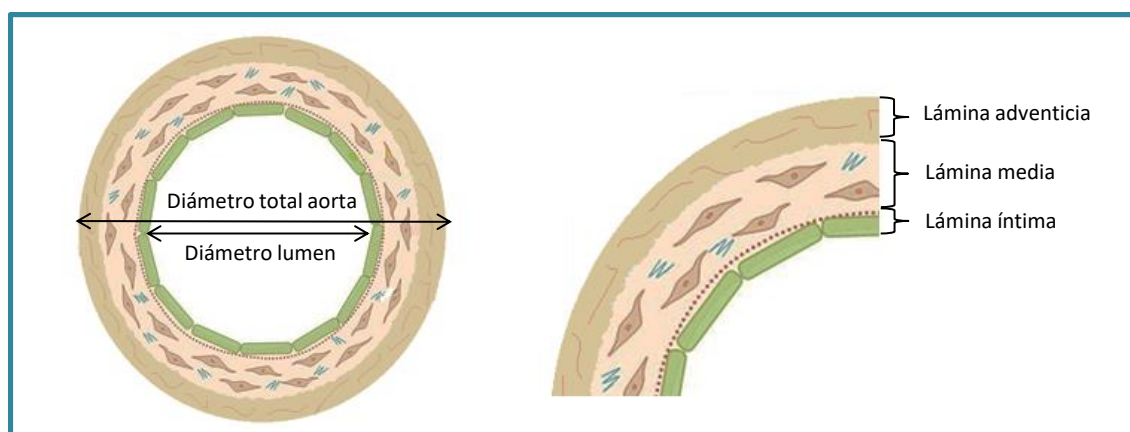


Figura 1. Esquema representativo de un corte transversal de la aorta y detalle ampliado de la estructura de la pared arterial.

La **matriz extracelular** (MEC) es un componente esencial del tejido conectivo que rodea las células de la pared vascular. Es sintetizada por los diversos tipos celulares presentes en la pared arterial y se compone de múltiples proteínas estructurales, entre las que se incluyen colágeno (I y III la más abundante), elastina, fibronectina y proteoglicanos (6, 7). Además de mantener la integridad celular y vascular, la MEC desempeña un papel fundamental en los procesos de señalización e interacción celular. La MEC mantiene la estructura de la pared arterial, le proporciona propiedades biomecánicas y participa en sus procesos fisiológicos (8). La integridad de la MEC en las tres láminas es esencial, ya que cambios en la síntesis y degradación de los componentes

de la MEC se traducen en cambios de composición y organización de la misma, afectando de esta forma a los procesos de adhesión, migración y proliferación celular.

2. ALDOSTERONA

La aldosterona es una hormona esteroidea perteneciente a la familia de los mineralocorticoides que es sintetizada principalmente en la corteza de las glándulas suprarrenales del riñón (9).

Las glándulas suprarrenales son glándulas endocrinas, situadas en el polo superior de cada riñón. En ellas se pueden diferenciar dos partes, una externa denominada corteza, y una interna denominada médula.

La corteza suprarrenal representa aproximadamente el 85-90% de la masa total de la glándula suprarrenal y rodea de manera completa a la médula. Secreta los dos tipos principales de hormonas corticoides: mineralocorticoides y glucocorticoides. Estas hormonas son sintetizadas a partir del colesterol y presentan una fórmula química similar, aunque con pequeñas variaciones en su estructura molecular que les proporcionan diferencias funcionales muy importantes (10).

2.1. Biosíntesis de la aldosterona.

Captación de colesterol.

El colesterol constituye el precursor de todas las hormonas esteroideas y puede tener tres orígenes diferentes: procedente de la dieta, sintetizado de *novo* a partir de acetato y coenzima A (proceso regulado por la enzima 3 β -hidroxi-3metilglutamil coenzima A [HMG-CoA] reductasa) y procedente de los depósitos en los tejidos

esteroidogénicos en forma de ésteres de colesterol. La mayoría del colesterol empleado en la síntesis de las hormonas esteroideas proviene de la dieta y es captado del plasma en forma de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol). La captación de LDL-colesterol en la glándula suprarrenal es estimulada por la hormona adrenocorticotropa (ACTH), que incrementa el número de receptores de LDL de la célula corticoadrenal y la actividad de las enzimas que liberan el colesterol a partir de las LDL. La unión de las LDL y el receptor produce la internalización a la célula de las LDL y de los ésteres de colesterol que van unidos a ellas. Las LDL son degradadas por proteasas y los ésteres de colesterol son transformados en colesterol libre. El colesterol se esterifica de nuevo y se almacena en el citoplasma en el interior de las vacuolas lipídicas, proceso que depende de la actividad de dos enzimas, la colesterol-éster-sintetasa y la colesterol-esterasa. La estimulación con ACTH aumenta la actividad colesterol-esterasa, inhibiendo la esterificación del colesterol, lo que hace que aumente el colesterol libre disponible para la biosíntesis de hormonas.

El primer paso, común en la síntesis de todas las hormonas esteroideas, es la conversión del colesterol a pregnenolona. Dicha conversión tiene lugar en la membrana mitocondrial interna, donde se escinde la cadena lateral de colesterol para producir pregnenolona (11). Esta reacción es catalizada por la enzima divisora de la cadena lateral del colesterol CYP11A1. El paso limitante de la síntesis de aldosterona es la unión del colesterol al sitio activo de la enzima CYP11A1 o aldosterona sintetasa. Una vez se ha producido la conversión de colesterol a pregnenolona, ésta se transforma en el retículo endoplásmico mitocondrial, en progesterona y ésta en 11-deoxicorticosticosterona (DOC), reacciones en las que interviene las enzimas 3β -ol-deshidrogenasa y la 21-hidroxilasa, respectivamente (12). El último paso de la ruta de síntesis está catalizado

por la enzima mitocondrial CYP11B2, que presenta actividad de 11 β -hidroxilasa, 18-hidroxilasa y 18-oxidasa (13-15) (Figura 2).

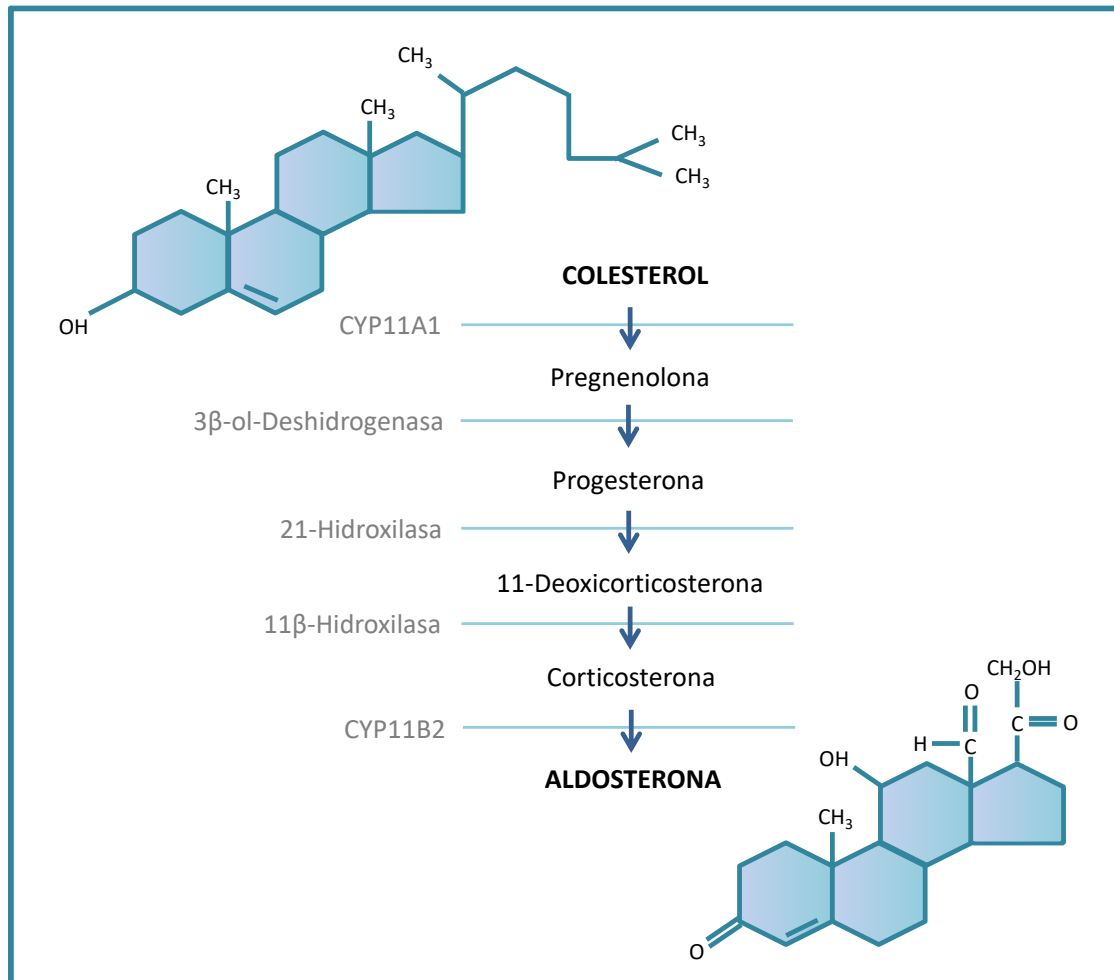


Figura 2. Síntesis de aldosterona a partir de colesterol y enzimas implicadas.

2.2. Síntesis endógena de aldosterona.

La aldosterona, además de sintetizarse en la corteza de las glándulas suprarrenales, también es producida en otras partes del organismo, tales como los tejidos: adiposo (16), vascular (17) y cardíaco (18). En condiciones fisiológicas, la síntesis endógena de aldosterona en los vasos sanguíneos es poco significativa (14). Sin embargo, en condiciones fisiopatológicas, un incremento en la síntesis local de aldosterona podría exacerbar sus efectos perjudiciales asociados a la patología cardiovascular (19), aumentando la reactividad, la resistencia periférica y el remodelado vascular (20).

2.3. Metabolismo de la aldosterona.

La aldosterona es rápidamente metabolizada, principalmente a su paso por el hígado, pero también a su paso por el riñón, mediante su transformación en diversos metabolitos y conjugados. La degradación de la hormona se produce a través de cambios metabólicos que impiden el reconocimiento por sus receptores y que aumentan su solubilidad en agua, lo que facilita su excreción a través de la orina. De esta manera, la cantidad de aldosterona que aparece en la orina sin alterar es prácticamente despreciable. El hígado es el órgano principal donde tienen lugar las conversiones metabólicas de la aldosterona. La mayoría de las modificaciones consisten en cambios de grupos cetónicos por hidroxilos, los cuales poseen mayor polaridad y pueden conjugarse con grupos sulfatos o glucoronatos, que a su vez aumentan más la solubilidad de la molécula en agua. El 90% de la aldosterona es eliminada por la orina y el resto por

el tracto gastrointestinal. La aldosterona presenta una vida media corta, de aproximadamente 15 minutos (21).

2.4. Mecanismo de acción de la aldosterona.

La aldosterona, al igual que otras hormonas esteroideas, se fija a receptores intracelulares específicos en las células diana. Los receptores de mineralocorticoides (RM) y glucocorticoides pertenecen a una superfamilia de receptores hormonales nucleares que comparten una estructura general común (más del 90% de homología) y un extremo C-terminal de 66-68 aminoácidos de reconocimiento específico. Ninguno de los dos receptores son realmente específicos para sus ligandos, especialmente los RM, que presentan una alta afinidad por la aldosterona aunque también pueden ligar con glucocorticoides.

Los órganos diana de los mineralocorticoides como la aldosterona, contienen una enzima denominada 11 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa tipo 2 (11- β -HSD2), encargada de convertir el cortisol en cortisona, que carece de capacidad para unirse al RM. De esta manera, la enzima impide que el cortisol cuya concentración circulante es de 100 a 1000 veces superior a la de la aldosterona, ejerza sus efectos sobre este receptor en las células diana. La aldosterona, posee un grupo hemiacetal C11-C18 y no sirve de sustrato para la enzima, pudiendo así llegar intacta al interior de la célula para interactuar con el RM (22, 23).

En ausencia de ligando, el RM presente en el citoplasma celular interacciona con diversas proteínas chaperonas tales como hsp90, hsp70, proteínas p23 y p48,

immunofilina FKBP-59 o ciclofilina CYP40. Estas proteínas desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la conformación del RM previa a la unión a la aldosterona. Al producirse la unión de la hormona al receptor, éste se disocia de las proteínas chaperonas y se transloca al núcleo donde regula la transcripción de diversas proteínas, entre ellas la quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1 (SGK1), uno de los principales mediadores de las acciones de la aldosterona (24-26).

2.5. Acciones de la aldosterona.

La aldosterona ejerce sus acciones a través de mecanismos genómicos y no genómicos.

2.5.1. Acciones genómicas de la aldosterona.

Las acciones genómicas dependen de la transcripción de un gen y de la síntesis de nuevas proteínas. Son acciones de desarrollo lento (60 a 90 minutos). La aldosterona ejerce sus acciones genómicas actuando vía el RM, localizado en el citoplasma de la célula diana. Cuando la aldosterona se une al RM, induce un cambio conformacional en el mismo y lo activa (27). A continuación, el complejo aldosterona-RM migra al núcleo como un dímero donde se une a secuencias específicas del genoma iniciando la transcripción de determinados genes y modulando la síntesis de ciertas proteínas que median en el transporte de varios iones como: sodio, potasio e hidrógeno (21, 28, 29). El transporte comprende el movimiento pasivo de iones a través de la membrana apical de la célula, así como el movimiento activo por medio de la bomba Na^+/K^+ ATPasa

presente en la membrana basolateral de la célula (30). El transporte activo de sodio mediado por la bomba Na^+/K^+ ATPasa genera un gradiente electroquímico que favorece la entrada pasiva de sodio a través de la membrana apical (21, 31, 32) (Figura 3).

La aldosterona también estimula la absorción de sodio y la excreción de potasio por las células epiteliales de los túbulos renales, en particular, por las células principales de los túbulos colectores de las nefronas distales (21). Su acción es estimulada por la concentración plasmática de sodio y de potasio, y por la presencia de ACTH y de angiotensina II (AII). En presencia de aldosterona, prácticamente todo el sodio existente en el líquido tubular se reabsorbe, de forma que su concentración en orina es muy baja. Paralelamente aumenta la reabsorción de agua y el volumen del líquido extracelular resulta incrementado.

La concentración elevada de potasio tiene un efecto directo sobre la glándula suprarrenal, promoviendo la secreción de aldosterona. El mecanismo a través del cual la aldosterona aumenta la excreción de potasio es el mismo por el que aumenta la reabsorción de sodio, promoviendo un aumento de la permeabilidad de los canales de sodio de la membrana apical y de la bomba Na^+/K^+ ATPasa en la basolateral. Como resultado se forma un gradiente electroquímico que hace que el potasio difunda pasivamente hacia la luz tubular por la membrana apical a través de los canales de potasio ROMK, lo que produce la secreción de este ion (Figura 3). El flujo de potasio, al contrario de lo que ocurre con el sodio, no implica movimiento de agua, por ello, la ausencia de aldosterona puede originar un aumento anormal de los niveles plasmáticos de potasio.

2.5.2. *Mediadores implicados en el transporte de sodio: SGK1, ENaC y Nedd4-2.*

Quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1, SGK1.

El SGK1 fue identificado inicialmente como una enzima serina-treonina quinasa inducida de manera rápida por los glucocorticoides en una línea celular de tumor mamario (33). Se expresa de forma ubicua en la mayoría de los tejidos que se encuentran bajo el control de hormonas como los glucocorticoides y los mineralocorticoides o regulados transcripcionalmente por cambios osmóticos (34, 35). Se han descrito dos isoformas muy relacionadas, SGK2 y SGK3, las cuales comparten con SGK1 un 80% de su secuencia de aminoácidos en su dominio catalítico (36).

Esta quinasa está regulada transcripcionalmente por diversos estímulos, entre los que se encuentran los glucocorticoides y los mineralocorticoides como la aldosterona (33, 35, 37, 38). El complejo aldosterona-RM se une a elementos de respuesta hormonal en la secuencia reguladora del promotor de los genes diana en el núcleo (39), e induce la expresión de SGK1 y del factor inductor de la hormona corticosteroide (CHIF). El aumento de expresión de SGK1 estimula la reabsorción de sodio y agua a través del canal epitelial de sodio (ENaC) (40) (Figura 3).

Canal epitelial de sodio, ENaC.

ENaC es una proteína heteromultimérica de membrana, que consta de tres subunidades homólogas (α , β y γ) que contienen en su región C-terminal una región rica en prolina o motivo PY, de interacción con proteínas con presencia de dominios ricos en triptófano o dominios WW (41, 42). Se expresa en la membrana apical de las células de tejido epitelial que transportan sodio, como aquel presente en las regiones distales del riñón (43). A su vez, se ha demostrado la expresión fisiológica de ENaC en tejidos no epiteliales como: endotelial vascular, muscular liso vascular, neuronal (42) y cardiaco (44).

La regulación de la actividad del canal es compleja, y está modulada por diversos estímulos hormonales, tales como la vasopresina, la insulina (45) y mineralocorticoides como la aldosterona (37, 46, 47). La aldosterona es un potente activador de la actividad de ENaC en la nefrona distal, donde incrementa la actividad y la biosíntesis de los transportadores de sodio de la membrana celular (48). La aldosterona además induce la expresión de α ENaC en la nefrona distal y de β y γ ENaC en el colon (49). La hormona actúa sobre ENaC en una primera fase regulando al alza la expresión de proteínas implicadas en la maquinaria de transporte de sodio y la expresión de mediadores de las acciones de la hormona tales como SGK1 (47). La fase tardía implica la síntesis de *novo* de ENaC, vía RM y la activación de la transcripción de ENaC (50) o a través de mecanismos indirectos (51), aumentando de esta forma la producción y la vida media de ENaC (45).

Ubiquitina ligasa E3, Nedd4-2.

Nedd4-2 es una proteína ubiquitina ligasa que se expresa en varios tejidos, entre los que se incluyen tejido cardíaco (52), cerebral (53), pulmonar (54) y renal (55). Presenta una estructura modular que consta de diversos dominios: un dominio de calcio de unión a fosfolípidos en el extremo N-terminal; entre dos y cuatro dominios WW (dominios de interacción proteína-proteína) y un dominio HETC en el extremo C-terminal (56).

Nedd4-2 actúa como regulador negativo de diversos canales iónicos incluyendo: ENaC (57), el cotransportador de sodio/cloro (NCC) (58) o los canales de potasio (HERG) (59) en los diversos tejidos en los que se expresa (60).

Interacción SGK1-ENaC-Nedd4-2.

La aldosterona, por medio de SGK1, estimula la actividad de ENaC de manera directa mediante la fosforilación del canal y de manera indirecta mediante la fosforilación de Nedd4-2, resultando dicha interacción en una mayor entrada de sodio a la célula (37, 55, 61).

SGK1 interacciona con ENaC y aumenta su actividad, como se ha demostrado en estudios previos en oocitos de *Xenopus laevis*, células de los conductos colectores corticales, células A6, células epiteliales respiratorias y neuronas (37, 62). SGK1 estimula a ENaC de dos maneras diferentes. En primer lugar aumenta la actividad del canal de forma directa por medio de la fosforilación del mismo (63, 64). En segundo lugar, SGK1

regula la actividad de ENaC indirectamente por medio de la fosforilación, y por tanto inactivación de la ubiquitina ligasa Nedd4-2 (pNedd4-2) (65, 66). La fosforilación constituye un importante mecanismo regulatorio de Nedd4-2 y otras ligasas E3 (67). Nedd4-2 actúa como supresor de ENaC, regulando los niveles del canal en la membrana plasmática de la célula. Al unirse la ubiquitina ligasa con ENaC, se produce la ubiquitinación y la consecuente internalización y posterior degradación del canal (37, 43, 56, 68). SGK1, al fosforilar a Nedd4-2, promueve además la interacción de la ubiquitina ligasa con la proteína 14-3-3, alterando la actividad de la quinasa y su localización subcelular (68). De este modo, se bloquea la unión entre Nedd4-2 y ENaC reduciéndose así la endocitosis y posterior ubiquitinación del canal (55, 69) (Figura 3). Como consecuencia de unos niveles elevados de aldosterona, la interacción entre SGK1, ENaC y Nedd4-2 resulta en el aumento de la entrada de sodio a la célula, relacionándose el aumento excesivo de sodio en la célula con el desarrollo de alteraciones vasculares como la hipertensión y la fibrosis, entre otras (34).

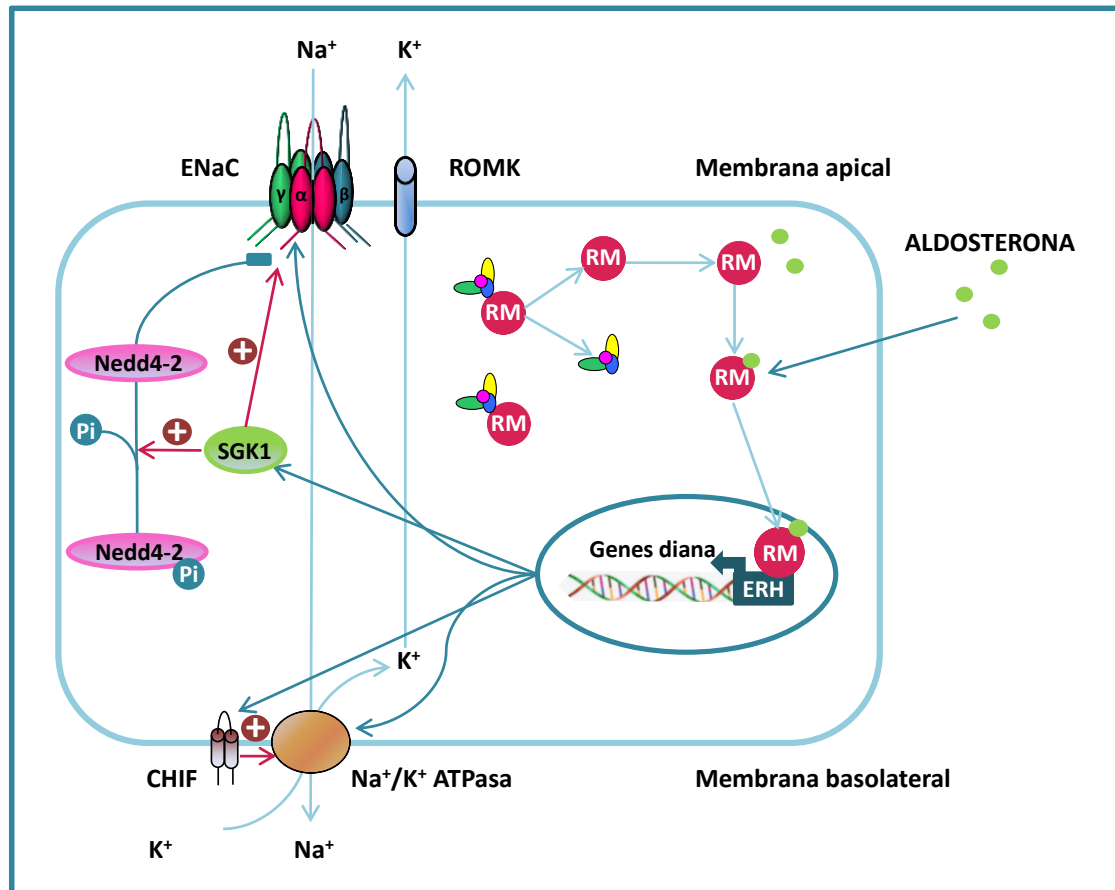


Figura 3. Mecanismo de acción de la aldosterona en una célula principal del túbulo colector cortical. La aldosterona difunde al interior de la célula diana, donde en el citoplasma, se une al RM. El complejo aldosterona-RM se transloca al núcleo, donde desencadena la síntesis de diversas proteínas, entre ellas SGK1, uno de los principales mediadores de las acciones de la aldosterona. En la membrana apical se encuentra ENaC, compuesto por tres subunidades (α , β y γ), el cual constituye el paso limitante en la entrada de sodio. El sodio sale a través de la membrana basolateral por la acción de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, cuya actividad está controlada por CHIF. SGK1 juega un papel importante en la reabsorción de sodio, estimulando la actividad de ENaC mediante fosforilación directa del canal. ENaC por otro lado, está regulado negativamente por Nedd4-2, el cual promueve la internalización y posterior degradación del canal. Por último, SGK1, favorece la fosforilación de Nedd4-2, y por tanto su inactivación, promoviendo así la actividad de ENaC de manera directa e indirecta.

2.5.3. Acciones no genómicas de la aldosterona.

Las acciones no genómicas de la aldosterona tienen lugar de manera rápida, en segundos o pocos minutos, y no necesitan la transcripción de un gen, ni por tanto la síntesis de nuevas proteínas. Se dan de dos maneras diferentes, a través del RM, o de manera independiente al mismo, mediante la interacción con otro receptor presente en la membrana celular que se acopla a sistemas de segundos mensajeros (70).

Se han descrito diversos mecanismos no genómicos de la aldosterona en diferentes células y tejidos. La aldosterona desencadena la activación de cascadas de segundos mensajeros incluyendo algunos como el inositol trifosfato (IP_3), los iones de calcio, la proteína quinasa C (PKC), la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y la quinasa regulada por señal extracelular (ERK 1/2) (71).

El RM media aproximadamente el 50% de estos efectos no genómicos de la aldosterona. La activación de estas cascadas puede darse por fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en la membrana plasmática de la célula por la tirosin quinasa citosólica c-Src. La actividad quinasa fosforila los canales de membrana y algunos metabolitos secundarios, estimulando la actividad de los canales Na^+/K^+ (71).

Estudios previos llevados a cabo en células endoteliales y de músculo liso sugieren que las acciones no genómicas de la aldosterona que se desencadenan de manera independiente al RM, podrían implicar a un receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) presente en la membrana celular y asociado a la regulación del calcio intracelular y a la síntesis de IP_3 (31, 49).

2.6. Regulación de la secreción de aldosterona.

La secreción de aldosterona por las células de la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal está íntimamente relacionada con el control de las concentraciones de electrolitos y el volumen del líquido extracelular, el volumen sanguíneo y la presión arterial. Se conocen factores tanto estimulantes como inhibidores de la síntesis y secreción de aldosterona. Entre los principales estímulos se encuentra la AII, la ACTH, la disminución de los niveles plasmáticos de sodio y el incremento de los niveles plasmáticos de potasio. Por otro lado, los principales inhibidores de la síntesis de esta hormona serían el péptido natriurético auricular (PNA) y la dopamina.

2.6.1. *Angiotensina II.*

La AII es el principal regulador de la síntesis de aldosterona. Una disminución del líquido extracelular o del volumen circulante da lugar a una hipotensión y a una disminución de la presión de perfusión renal que estimula a las células del aparato yuxtaglomerular a liberar renina. La renina es una enzima proteolítica cuyo sustrato es una globulina sintetizada por el hígado, el angiotensinógeno, el cual se hidroliza y transforma en un decapeptico, la angiotensina I (AI), que es hidrolizada de nuevo por una enzima convertidora (ECA) para convertirse en AII, la forma activa del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).

La AII regula la síntesis de aldosterona a través de diversos mecanismos. Mediante su unión con los receptores AT_1 , la AII activa la fosfolipasa C, la cual produce

la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato a diacilglicerol (DAG) y de IP₃. El DAG se encarga de activar a la PKC, la cual inhibe la transcripción de la 17 α -hidrolasa e incrementa la actividad de la proteína quinasa D (PKD), que actúa aumentando la transcripción de CYP11B2 en la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal (72-74).

Por otro lado, el IP₃ incrementa la liberación de calcio intracelular y activa las calcio calmodulinas quinasas (CaMKs), las cuales actúan favoreciendo la fosforilación y la activación de factores de transcripción del gen CYP11B2. Por último, la AII activa la síntesis de aldosterona mediante el incremento en la expresión de los receptores de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y LDL en las células, aumentando así la biodisponibilidad de colesterol para la esteroidogénesis o síntesis de hormonas esteroideas (74).

2.6.2. Hormona adrenocorticotropa.

La ACTH actúa como un regulador secundario de la secreción de aldosterona, modulando la secreción basal de la hormona y activando el paso de colesterol a pregnenolona por medio de la regulación de la expresión de CYP11A1 y otras enzimas relacionadas con la esteroidogénesis (72, 73).

La ACTH media la síntesis de aldosterona mediante su unión al receptor de melanocortina tipo 2, activando de esta forma la adenilato ciclasa (AC). La AC convierte el adenosin trifosfato (ATP) en adenosín monofosfato cíclico (AMPc), el cual activa la proteína quinasa A (PKA), induciendo así un flujo lento pero mantenido de iones de calcio a través de los canales de calcio voltaje dependiente de tipo L. Además, la PKA

actúa fosforilando y activando a la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), incrementando así el transporte de colesterol a la membrana mitocondrial interna, paso limitante en la ruta de síntesis de la aldosterona (74).

2.6.3. Niveles plasmáticos de sodio.

La aldosterona favorece la absorción de sodio conservándolo en el líquido extracelular, por lo que la disminución de sus niveles plasmáticos promueve la secreción de la hormona por medio de la estimulación del SRAA.

2.6.4. Niveles plasmáticos de potasio.

El incremento de la concentración de potasio en el líquido extracelular es uno de los principales estímulos de la secreción de aldosterona. La acción del potasio sobre la aldosterona es directa e independiente de la acción del sodio y de la AII, ya que el potasio extracelular inhibe la liberación de renina.

Al igual que en el caso de la AII, niveles aumentados de potasio estimulan la actividad de las CaMKs, resultando en un aumento de la entrada de calcio a la célula. Un pequeño aumento en los niveles de potasio en el líquido extracelular produce la despolarización de la membrana plasmática de la célula glomerulosa activando así los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L y tipo T, favoreciendo la entrada de calcio proveniente del líquido extracelular al interior de la célula (74). Este incremento

en la entrada de calcio regula de manera positiva la expresión de CYP11B2 y por tanto la síntesis de aldosterona (72, 74).

2.6.5. Péptido natriurético auricular.

El PNA es producido por las células musculares cardíacas en respuesta a un aumento de la presión arterial o del volumen del líquido extracelular. Disminuye la reabsorción de sodio en el túbulo colector por inhibición de la expresión de los canales específicos de sodio en la nefrona distal: la bomba Na^+/K^+ ATPasa en la membrana basolateral y los canales de sodio en la membrana apical.

El PNA inhibe la biosíntesis de aldosterona y la secreción de renina, oponiéndose al SRAA. Esta inhibición de la secreción de aldosterona se produce en las primeras etapas de la esteroidogénesis y en menor grado inhibiendo la conversión de corticosterona en aldosterona.

2.7. Hiperaldosteronismo.

El hiperaldosteronismo es un trastorno metabólico caracterizado por una producción y secreción anormalmente alta de aldosterona por parte de las glándulas suprarrenales que determina una retención de sodio y agua y un aumento en la excreción de iones potasio e hidrógeno. Se diferencian dos tipos, hiperaldosteronismo primario y secundario.

2.7.1. Hiperaldosteronismo primario o síndrome de Conn.

Frecuentemente aparece como consecuencia de un tumor en la zona glomerulosa que causa una hiperproducción de aldosterona y una supresión de la actividad de la renina en plasma. En otros casos existe una hiperplasia no tumoral y benigna de las células de la corteza suprarrenal que secretan la hormona, denominado hiperaldosteronismo idiopático o hiperplasia suprarrenal bilateral. Las consecuencias más importantes del hiperaldosteronismo primario son la hipopotasemia, un ligero aumento del volumen extracelular y del volumen sanguíneo, un incremento mínimo de la concentración plasmática de sodio e hipertensión (75).

2.7.2. Hiperaldosteronismo secundario.

Aparece como consecuencia de un exceso en la secreción de aldosterona secundario a una excesiva activación del SRAA. El hiperaldosteronismo secundario puede cursar con o sin hipertensión arterial. En las formas hipertensivas la hiperproducción de renina se da como consecuencia de una disminución del flujo plasmático renal, o de una secreción tumoral autónoma de la misma. En las formas no hipertensivas el hiperaldosteronismo aparece como respuesta a una disminución del volumen circulante, lo cual estimula la secreción de renina.

3. ALTERACIONES VASCULARES ASOCIADAS AL EXCESO DE ALDOSTERONA

El exceso de aldosterona participa en el desarrollo de alteraciones vasculares tales como la inflamación, el estrés oxidativo, la disfunción endotelial o el remodelado vascular (6, 76-78).

3.1. Alteraciones estructurales.

La pared arterial puede sufrir diferentes alteraciones que tienen como consecuencia el desarrollo del **remodelado arterial**.

3.1.1. Remodelado de la pared arterial.

El remodelado de la pared arterial es un proceso activo caracterizado por el desarrollo de alteraciones en al menos cuatro procesos celulares: el crecimiento, la apoptosis, la migración celular y la síntesis o degradación de la MEC. Este proceso depende de interacciones dinámicas entre factores de crecimiento endógenos, factores vasoactivos y estímulos hemodinámicos. De esta forma, el remodelado arterial constituye un mecanismo de adaptación que a largo plazo puede participar en el desarrollo de patologías vasculares (79, 80). La aldosterona ejerce un efecto importante sobre la estructura de la pared arterial, asociándose su exceso con el remodelado de arterias de diferente calibre (81-84). La aldosterona modula diversos receptores de

membrana y moléculas de señalización e influye en las acciones de diversos agentes que producen efectos sobre la vasculatura. Como resultado puede producirse la vasoconstricción y el remodelado de la pared vascular, entre otros (78, 80, 85-88). Los efectos del remodelado arterial pueden apreciarse en las diferentes láminas que componen la pared arterial.

Lámina íntima: en el área donde el endotelio se encuentra dañado, las CMLV, normalmente quiescentes, comienzan a proliferar y a producir MEC, contribuyendo de esta forma al desarrollo del engrosamiento de la pared y a la fibrosis vascular. Así mismo, la acumulación de células mesenquimales así como sus productos en la lámina íntima, puede llegar a comprometer la luz del vaso, teniendo como consecuencia la disminución del diámetro del lumen (89, 90). En la lámina íntima, el exceso de aldosterona produce un aumento de volumen y rigidez de las CE (85), y dicho aumento del volumen celular podría ser debido a una entrada excesiva de sodio y a un aumento de la masa celular. Esto último se observó en un estudio *in vitro* con células HUVEC, viéndose dichos efectos bloqueados con el tratamiento con espironolactona (91), un antagonista del RM. A su vez, el remodelado del endotelio favorece la aparición de espacios entre las uniones intercelulares, alterando de esta forma el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular, lo que puede tener un impacto determinante en la función y estructura vascular (92, 93).

Lámina media: en la lámina media se produce un aumento del crecimiento y la proliferación de las CMLV (80, 94, 95), viéndose favorecido así el desarrollo de la hipertrofia de la pared vascular. A su vez, se producen cambios en la orientación y disposición circunferencial de las CMLV con respecto al eje longitudinal del vaso. Así mismo, las CMLV sufren cambios en su fenotipo, que estimulan el cambio de células

contráctiles a células con una alta capacidad secretora (96, 97). De esta manera, las CMLV comienzan a secretar colágeno de tipo I (98). Las cantidades absolutas y relativas de colágeno y elastina presentes en el vaso determinan las propiedades biomecánicas del mismo (6). En condiciones fisiológicas, la tasa de producción y renovación de colágeno en la pared vascular está muy regulada, siendo el ratio colágeno/elastina constante en el tiempo. Sin embargo, la alteración de los procesos de producción y renovación de colágeno vascular da lugar a un desequilibrio que se refleja en el aumento de fibras de colágeno y fibronectina (99, 100). El aumento del contenido de colágeno y la destrucción de la red de fibras de elastina junto con un entorno pro-inflamatorio contribuye a los procesos de fibrosis y remodelado de la pared arterial (100-102). Como consecuencia, se produce un aumento del grosor de la lámina media de la pared y del cociente que relaciona el grosor de la pared y el diámetro de la luz del vaso (103). En la lámina media, la aldosterona induce el crecimiento y la proliferación de las CMLV (80, 84, 104). Este impacto sobre la pared arterial se ha observado en pacientes con hiperaldosteronismo primario, los cuales mostraban un ratio media/lumen aumentado, a causa del engrosamiento de la lámina media y al estrechamiento del lumen arterial (105).

Lámina adventicia: en respuesta a situaciones de estrés, los fibroblastos de la lámina adventicia se activan y sufren una serie de cambios funcionales. Se produce un aumento de la proliferación celular, de la expresión de proteínas contráctiles en la MEC y de la secreción de factores que afectan de forma directa al tono y crecimiento de las CMLV de la lámina media (106, 107). En la lámina adventicia, la aldosterona promueve el acúmulo de colágeno y el aumento de la rigidez de la pared arterial a través de mecanismos que incluyen la activación de la autofagia de los fibroblastos (108).

3.2. Alteraciones funcionales.

3.2.1. *Hipertensión arterial.*

La hipertensión arterial se define como la elevación mantenida de la presión arterial por encima de los límites considerados normales: presión arterial sistólica (PAS) menor o igual a 140 mmHg y presión arterial diastólica (PAD) menor o igual a 90 mmHg (109). La hipertensión arterial es en la actualidad la patología crónica más frecuente en los países desarrollados, llegando a afectar a aproximadamente el 20% de la población (110). Constituye de esta forma un factor importante de riesgo de infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, accidente cerebrovascular y enfermedad cardiovascular (ECV), representando el 41% de todas las muertes por ECV (111-114).

El desarrollo de hipertensión se produce en respuesta a diversos factores fisiopatológicos tales como el aumento de la actividad del sistema nervioso simpático (115), el estrés (116) y la sobreproducción de factores vasoconstrictores o deficiencia de factores vasodilatadores (117). También se ha demostrado que niveles elevados de sodio (118) así como el aumento de la secreción de Angiotensina II y aldosterona (119), la diabetes y la resistencia a la insulina, entre otros (120, 121), participan en el desarrollo de hipertensión.

Numerosos estudios clínicos han demostrado que un exceso en la secreción de aldosterona contribuye de manera significativa al desarrollo de hipertensión (119, 122-125). La primera evidencia del papel relevante de la aldosterona en el desarrollo de hipertensión arterial se obtuvo en 1954, cuando se observó que la eliminación de un

adenoma adrenal reducía los niveles de presión arterial (126). El aldosteronismo primario constituye la forma más común de hipertensión secundaria de carácter endocrino. Tiene lugar cuando las glándulas suprarrenales producen una cantidad excesiva de aldosterona de forma parcial o completamente autónoma del SRAA (110, 127, 128). El incremento de los niveles plasmáticos de aldosterona se relaciona con valores elevados de presión arterial y son considerados un indicador temprano del desarrollo de hipertensión (129-131). Por otro lado, la producción endógena de aldosterona en la pared arterial también podría contribuir al desarrollo de hipertensión arterial, induciendo el aumento de la reactividad, la resistencia periférica y el remodelado vascular (19, 20).

Así mismo, la alta prevalencia de la hipertensión arterial y la insuficiencia cardíaca asociadas con el hiperaldosteronismo primario y secundario, pone de manifiesto el papel del exceso de aldosterona en el daño cardiovascular y la importancia del bloqueo de sus acciones. En el estudio RALES (*Randomized Aldactone Evaluation Study*), la administración del antagonista del RM espironolactona, junto con el tratamiento estándar con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), β -bloqueantes, digoxina y diuréticos, produjo efectos favorables en el manejo de la insuficiencia cardíaca (132). Después de un seguimiento de 24 meses, se observó una reducción de la mortalidad en un 30%, tanto por progresión de la ECV como por disminución de la muerte súbita. A su vez, el estudio EPHESUS (*Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study*), demostró en 6.632 pacientes con disfunción sistólica tras infarto agudo de miocardio, que el bloqueo temprano de la aldosterona con el fármaco antagonista del RM, eplerenona, junto con la terapia convencional, disminuía, tras un seguimiento de 16 meses, un 15% la

mortalidad global, un 17% la mortalidad cardiovascular y un 21% la muerte súbita (133). A los 30 días, se demostró que la eplerenona reducía la mortalidad por todas las causas observadas en el estudio en un 32% y el riesgo de muerte súbita en un 37% (134, 135).

3.2.2. Disfunción endotelial.

La disfunción endotelial es una alteración de la función vasomotora caracterizada por una relajación dependiente del endotelio reducida, e implica cambios en una o varias funciones vasculares reguladas por factores endoteliales (136-138). Es una de las primeras manifestaciones de las alteraciones vasculares y se asocia a diversos factores de riesgo cardiovascular, como la hipercolesterolemia (139), la resistencia a la insulina (140), los niveles elevados de sodio (141) y la hipertensión (142). En condiciones fisiológicas, el endotelio regula el tono vascular mediante la liberación de factores vasoconstrictores y vasodilatadores, incluyendo el óxido nítrico (NO), metabolitos del ácido araquidónico, especies reactivas de oxígeno (EROs) y péptidos vasoactivos (Savoia, et al. 2011b; Su 2015).

La aldosterona está directamente implicada en el desarrollo de la disfunción endotelial, ya que modula la resistencia vascular, promueve la disminución de la síntesis y biodisponibilidad de NO y aumenta la generación de EROs que degradan el NO (143). A su vez, el exceso de aldosterona hace que las CE sufran procesos de activación que conllevan a la alteración de la homeostasis del endotelio. Esto último se refleja en una capacidad vasodilatadora reducida, inflamación vascular así como en un aumento de la proliferación celular, todo ello asociado al desarrollo de disfunción endotelial (137, 144).

En un estudio *in vitro* en CE se demostró que la exposición a aldosterona durante 72 horas promovía el aumento del tamaño y de la rigidez celular, así como una mayor tensión de la membrana apical (91). Por otro lado, determinados estudios en pacientes han demostrado que la presencia de niveles elevados de aldosterona en plasma se asocia con un mayor riesgo de sufrir hipertensión y disfunción endotelial (145). Esto último ha sido observado en ensayos clínicos en los que la infusión de aldosterona tanto en sujetos control como en sujetos con insuficiencia cardíaca resultaba en la alteración de la función endotelial normal (146, 147). Por último, también se ha demostrado el papel que desempeña la aldosterona en el desarrollo de la disfunción endotelial en diferentes modelos experimentales (143, 148-150). Un ejemplo de ello es un estudio en el que se observó que la vasodilatación dependiente de acetilcolina (ACh) disminuía en la arteria mesentérica de ratas hipertensas, normalizándose con el tratamiento con eplerenona (149). Otro trabajo demostró que tanto la administración de AII como de aldosterona resultaban en una disminución de la vasodilatación en arteria mesentérica de rata (151). Por último, un estudio con ratas espontáneamente hipertensas puso de manifiesto los efectos del tratamiento con eplerenona, observándose una disminución de la PAS, así como la normalización del ratio media/lumen de la aorta y de la vasodilatación dependiente de ACh (152).

3.3. Alteraciones moleculares.

3.3.1. *Inflamación.*

La respuesta inflamatoria está mediada por péptidos de pequeño tamaño denominados citoquinas. Las citoquinas son factores químicos que median la activación, la proliferación y la migración celular a través de su unión a sus receptores de alta afinidad en la membrana celular. La mayoría son moléculas multifactoriales que ejercen diferentes acciones en las células sobre las que actúan. Las citoquinas liberadas en la respuesta inflamatoria son fundamentalmente la interleuquina 6 (IL-6), la interleuquina 1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (153-155).

Las CE desempeñan un papel importante en el inicio y la regulación del proceso inflamatorio, ya que coordinan el reclutamiento de las células del sistema inmune a los lugares donde existe un daño tisular o infección. Durante el proceso inflamatorio, las CE adquieren un fenotipo "activo", induciendo así un aumento de la permeabilidad vascular a las proteínas del plasma. A su vez, las CE activas promueven la expresión de diversas citoquinas proinflamatorias, quimiocinas, enzimas y moléculas de adhesión (156). La inflamación vascular está ligada íntimamente a los procesos de hipertensión y disfunción endotelial (157), y ésta favorece el proceso inflamatorio, el cual, a su vez participa en el desarrollo de las alteraciones funcionales del endotelio.

La aldosterona participa en la respuesta proinflamatoria vascular (78, 85, 158, 159), estimulando la producción de diversas citoquinas proinflamatorias, tales como TNF α , IL-1 β y IL-6 (160, 161). Así mismo, la aldosterona es un potente activador del

factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), un importante factor de transcripción pro-inflamatorio (76). La activación de NF- κ B por la aldosterona induce la producción de moléculas de adhesión y de citoquinas pro-inflamatorias (149, 162-164).

Factor de necrosis tumoral alfa, TNF α .

El TNF α es una citoquina inflamatoria producida por diversos tipos celulares como monocitos, macrófagos, células T, células de músculo liso y fibroblastos (165-167). Ejerce múltiples efectos, entre ellos la activación del factor NF- κ B, formando parte de la respuesta inflamatoria (165, 168).

El endotelio vascular es una de las dianas del TNF α (169). El TNF α , activa directa o indirectamente a las CE, reduciendo la relajación dependiente de endotelio y alterando la función vascular como han demostrado diversos estudios tanto en modelos experimentales como en pacientes (170-172). Así mismo, la unión del TNF α a su receptor conduce a la disminución de la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), reduciendo así la biodisponibilidad de NO vascular. Se ha demostrado un incremento de la expresión vascular del TNF α en situaciones patológicas como la disfunción endotelial en estudios en pacientes y en modelos experimentales (169, 170, 173). Así mismo, se ha comprobado que niveles elevados de aldosterona promueven el aumento de expresión vascular de TNF α (78, 161).

3.3.2. Fibrosis.

La fibrosis vascular es un proceso dinámico y reparativo que se desencadena como respuesta adaptativa frente a una pérdida de tejido parenquimatoso vascular. Se caracteriza por una excesiva acumulación de MEC en la zona dañada, que altera la estructura del tejido, llegando a producir disfunción arterial (174, 175).

De forma típica, la fibrosis es el resultado de un proceso inflamatorio persistente inducido por diversos estímulos. En fases tempranas la inflamación como parte de un proceso reparativo ante el daño tisular, resulta beneficiosa; sin embargo, a largo plazo, la respuesta inflamatoria favorece y acentúa la producción de citoquinas y factores de crecimiento fibrogénicos (176). El proceso de fibrosis es progresivo, observándose un aumento gradual de la rigidez de la pared arterial que se va extendiendo por el espacio intersticial a lo largo del tejido. La fibrosis se produce tanto en las arterias de gran calibre como en las de menor diámetro (6), caracterizándose por una disminución del diámetro del lumen y por un engrosamiento de la lámina media debido a la acumulación de MEC en la pared vascular (177).

Factor de crecimiento de tejido conectivo, CTGF.

El CTGF es un potente factor de crecimiento profibrótico implicado en los procesos de proliferación, diferenciación y adhesión celular, apoptosis, angiogénesis y síntesis de proteínas de la MEC tales como la fibronectina y diferentes tipos de colágeno,

entre otros (178-180). El CTGF se expresa en numerosos tejidos como el cardíaco, cerebral, hepático, renal y vascular (180, 181).

A nivel vascular, la expresión de CTGF está regulada tanto por factores estimulantes como inhibidores. Entre los factores estimulantes se encuentran el estrés mecánico (182), la Angiotensina II (Ang II) (6, 178), la aldosterona (183) y el TGF β 1 (6), constituyendo este último su principal inductor. Los factores inhibidores de la expresión de CTGF son el AMPc (184) y el NO (185, 186).

En las alteraciones cardiovasculares tales como arterosclerosis o hipertensión que cursan con un aumento de la acumulación de MEC, generalmente también se produce un aumento de la expresión de CTGF, tal y como han puesto de manifiesto diferentes estudios en modelos experimentales (178, 183, 187) y ensayos clínicos (181). En función del tipo celular, el CTGF presenta diversas funciones biológicas (186, 188). En las CMLV, el CTGF regula la proliferación, la migración y la apoptosis celular, así como la síntesis de MEC (189, 190). En el endotelio, la expresión del CTGF está estimulada por la Ang II, la endotelina 1 y el TGF β ; (189) los cuales promueven tanto la expresión de CTGF como la síntesis de proteínas de la MEC (178, 186).

3.3.3. Oxidación.

El proceso de oxidación tiene lugar debido a un aumento exacerbado de los mediadores de oxidación, que dan lugar al estrés oxidativo. Existen numerosas

evidencias que apuntan al estrés oxidativo como uno de los mecanismos que contribuye al desarrollo y empeoramiento de las alteraciones vasculares (77, 191, 192).

Radicales libres.

Los radicales libres son moléculas o átomos que contienen uno o más electrones no apareados y que pueden existir de forma independiente. La presencia de electrones desapareados hace que la molécula sea inestable y altamente reactiva. El electrón desapareado tiende a aparearse con otro electrón de otra molécula con el fin de estabilizarse, alterando así la estructura y la función de dicha molécula. De esta forma, los radicales libres actúan sobre importantes macromoléculas: lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, generando así importantes daños a nivel celular (193, 194).

Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo.

Los radicales libres provienen en su gran mayoría del oxígeno, tomando la denominación de EROs. El oxígeno molecular presenta dos electrones desapareados en los orbitales moleculares más externos, sin embargo, químicamente es bastante estable. Como consecuencia de ello, el oxígeno molecular acepta de forma preferente electrones de uno en uno de otros radicales, generando así los radicales libres anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) e hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), así como la especie no radical, peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este proceso se denomina reducción univalente del oxígeno (195) (Figura 4).

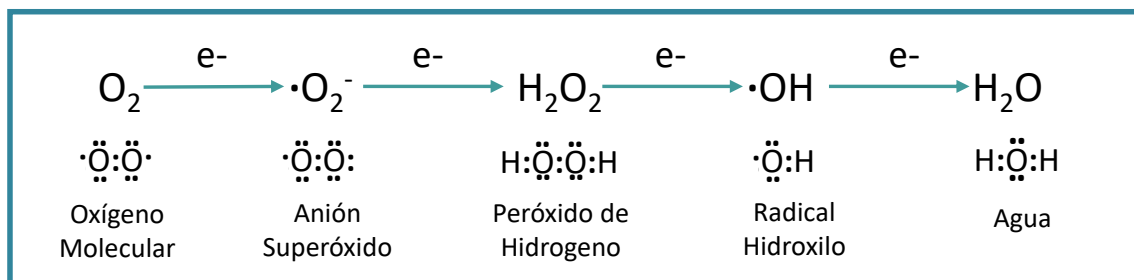


Figura 4. Reducción univalente del oxígeno molecular.

Una de las EROs más importante por sus acciones biológicas es el NO. El NO es un radical libre producido a partir del aminoácido básico L-arginina exclusivamente por la óxido nítrico sintasa (196), enzima de la que han sido descritas tres formas. La óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), inicialmente descubierta en el sistema nervioso, también se expresa de manera constitutiva en tejido vascular y muscular esquelético y cardiaco. La óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) cuya expresión es estimulada por diversos factores como citoquinas y endotoxinas bajo diversas circunstancias; y por último, la eNOS, la cual se expresa de forma constitutiva en las CE, y de la que depende principalmente la producción y regulación del NO en el endotelio en condiciones fisiológicas (197, 198). El NO cumple una serie de funciones fisiológicas relacionadas con la homeostasis del sistema vascular, tales como la regulación del tono vasomotor, la inhibición de la agregación plaquetaria, la inhibición de la adhesión y migración leucocitaria y la regulación de la proliferación y migración de las CMLV.

A continuación se describen brevemente las principales EROs que se encuentran en los sistemas biológicos (Tabla 1).

RADICALES LIBRES		
ESPECIES REACTIVAS	FÓRMULA	FORMACIÓN
Radical superóxido	$\cdot\text{O}_2^-$	Reducción de un electrón del O_2 en estado basal.
Radical hidropéroxilo	$\text{HOO}\cdot$	Protonación del radical superóxido.
Radical hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	Reducción de un electrón del peróxido de hidrógeno y reducción de 3 electrones del O_2 en estado basal.
Óxido nítrico o monóxido de nitrógeno	NO	Reducción de un electrón del nitrito.
Radical alcóxido	$\text{RO}\cdot$	Reducción de un electrón del hidroperóxido.
Radical péroxilo	$\text{ROO}\cdot$	Oxidación de un electrón del hidroperóxido.
ESPECIES NO RADICALES		
ESPECIES REACTIVAS	FÓRMULA	FORMACIÓN
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Reducción de 2 electrones del O_2 en estado basal, seguida de protonación del ión peróxido.
Peroxinitrito	ONOO^-	Reacción del NO con $\cdot\text{O}_2^-$
Hidroperóxido	ROOH	Autooxidación y oxigenación con O_2 de compuestos insaturados.
Ácido hipocloroso	HClO	Hidrólisis del cloro molecular.
Ozono	O_3	Oxidación de O_2 en estado basal con oxígeno atómico formado por fotólisis del oxígeno molecular en estado basal.

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno más representativas de los sistemas biológicos.

La alteración del equilibrio entre los factores pro-oxidantes y los factores antioxidantes celulares, da lugar a la aparición de una situación patológica denominada **estrés oxidativo** (199, 200). Las EROs son producidas en los organismos vivos como

resultado del metabolismo celular y de diversos factores ambientales, constituyendo moléculas altamente reactivas que pueden dañar los diferentes componentes celulares: los carbohidratos, los ácidos nucleicos, los lípidos y las proteínas; así como alterar sus funciones (199, 200).

Nicotinamida adenina dinucleótido oxidasa, NADPHox.

La NADPHox es un complejo multiproteico encargado de producir EROs en diferentes células y tejidos, constituyendo la mayor fuente de EROs en el sistema vascular (201). Es de gran importancia en las células fagocíticas, tales como neutrófilos y macrófagos, puesto que participa en la defensa del organismo frente a microorganismos patógenos, así como en la activación del proceso inflamatorio. A su vez, las EROs derivadas de la misma, son moduladores esenciales de diversas vías de señalización implicadas en el control de actividades fisiológicas tales como el crecimiento, la proliferación, la migración, la diferenciación y la apoptosis celular, así como la respuesta inmune (202, 203).

El sistema NADPHox (NOX), se compone de siete isoformas, que constituyen las subunidades catalíticas del sistema: Nox1-5 y Duox1-2, cada una de las cuales tiene una función y una distribución tisular específica; y de las siguientes subunidades reguladoras: p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox} (204). Cada subunidad forma un heterodímero con la subunidad p22^{phox}, dando lugar a la formación de un núcleo catalítico heterodimérico denominado citocromo B₅₅₈, a partir del cual la transferencia de electrones del mismo al oxígeno molecular resulta en la formación de $\cdot\text{O}_2^-$ (201). La subunidad p22^{phox} es

importante, ya que sin su participación, la actividad de la NADPHox se ve anulada (205, 206). La subunidad p22phox se encarga de estabilizar y activar la subunidad Nox y de favorecer las uniones entre esta última y las subunidades citosólicas p47^{phox} y p67^{phox} (201, 207).

La subunidad p22phox de la NADPHox, está altamente expresada en el sistema cardiovascular y es regulada por diversos estímulos, tales como la presencia de hormonas como la AI (208, 209), la aldosterona (210) o situaciones de daño vascular (208), observando que un estiramiento de la pared vascular es capaz de aumentar su expresión (211).

Óxido nítrico sintasa endotelial, eNOS.

La actividad de la eNOS depende de diversos factores como: los niveles de expresión génica y proteica de la enzima, así como la expresión de la dimetilarginina asimétrica, constituyendo esta última un inhibidor endógeno de la eNOS puesto que compite con la L-arginina para unirse con la enzima (Boger, et al. 1998). En la actividad de la eNOS también influyen la cantidad y la calidad de los cofactores como la tetrahidrobiopterina (BH₄) y la NADPH; necesarios para catalizar la producción de NO a partir de la L-arginina (212, 213). Por último, las modificaciones transcripcionales como las diversas fosforilaciones producidas en diferentes residuos de serina, treonina y tirosina ejercen su influencia sobre la actividad de la enzima (198). Se ha comprobado que las modificaciones post-transcripcionales que producen los cambios más marcados en la función de la eNOS, son la fosforilación en el residuo de serina 1177, la cual promueve su activación, y la fosforilación en el residuo de treonina 495, que por el

contrario, promueve la inhibición de la enzima (214). El NO liberado por la acción de la eNOS activa la guanilato ciclasa soluble mediante su unión al grupo hemo, desencadenando la conversión de guanosín trifosfato (GTP) a guanosín monofosfato cíclico (GMPc) produciéndose la relajación del músculo liso vascular. A su vez, el NO tiene efecto antiinflamatorio, antiproliferativo y antimigrativo sobre el endotelio contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis vascular (197).

La aldosterona ejerce un efecto inhibitorio sobre la eNOS por medio de la oxidación del cofactor BH₄ de la eNOS y mediante el desacoplamiento de la misma (215). La aldosterona favorece el aumento del estrés oxidativo a través de la estimulación del sistema NADPHox. De esta forma, las EROs derivadas del sistema NADPHox reaccionan con el NO sintetizado por la eNOS, generando peroxinitrito (ONOO⁻). El BH₄ es altamente sensible a la oxidación por el ONOO⁻, disminuyendo los niveles del mismo. Cuando la concentración de BH₄ disminuye, la transferencia de electrones que tiene lugar a través del sistema NADPHox se desacopla de la síntesis de NO, convirtiendo de este modo a la eNOS en una enzima productora de aniones superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) y favoreciendo de esta manera el aumento del estrés oxidativo y por tanto el desarrollo de disfunción endotelial (214, 216, 217).

Superóxido dismutasa 2, SOD2.

Las superóxido dismutasas (SODs) constituyen la primera línea de defensa enzimática frente a la producción de EROs, catalizando la reacción que convierte el $\cdot\text{O}_2^-$

en especies menos reactivas como el H_2O_2 (218, 219) e impidiendo así la oxidación de macromoléculas tales como el ADN, las proteínas, o los lípidos (220, 221).

En mamíferos existen tres isoformas de la SOD: la SOD1, la SOD2 y la SOD3. Cada isoforma es producto de genes diferentes y presenta una localización subcelular distinta, a pesar de lo cual catalizan la misma reacción (222). La SOD2 se localiza en la matriz mitocondrial, principal sitio de producción de radicales libres procedentes de la cadena de transporte de electrones (223).

4. FISIOLÓGÍA DE LA MITOCONDRIA

4.1. Estructura de la mitocondria.

La mitocondria es un orgánulo dinámico presente en el citoplasma de la mayoría de las células eucariotas. Las mitocondrias están formadas por un sistema de doble membrana que consiste en una membrana externa y una membrana interna separadas entre sí por el espacio intermembrana. La membrana interna presenta una superficie significativamente mayor que la externa al formar numerosos pliegues, denominados crestas, que se extienden hacia el interior del orgánulo, denominado matriz mitocondrial (224, 225) (Figura 5).

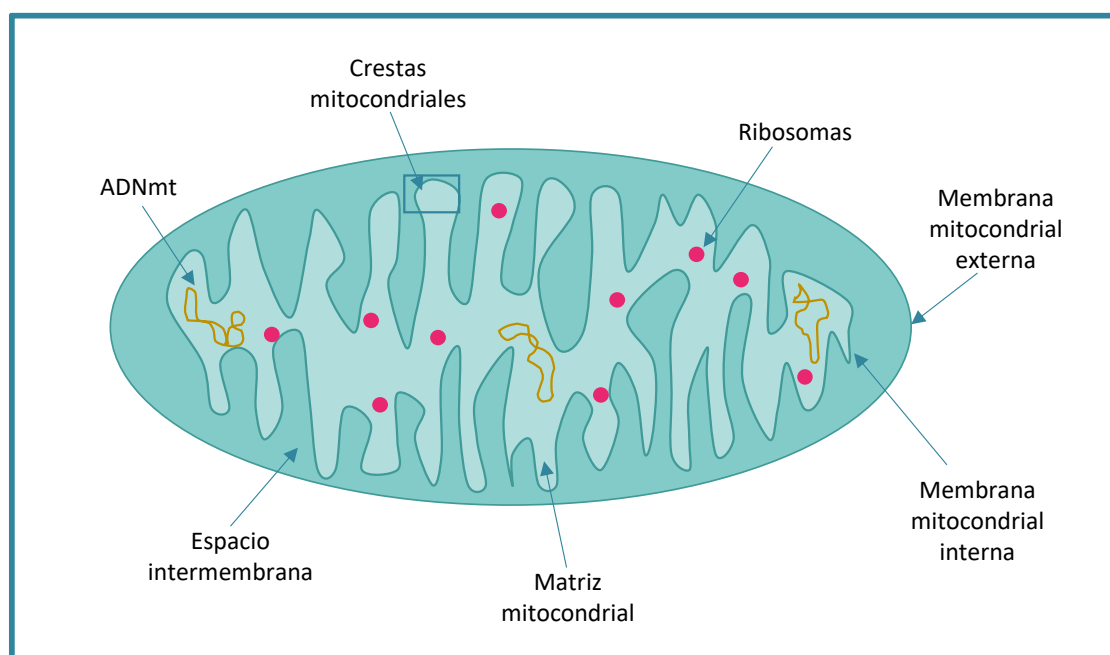


Figura 5. Representación de la estructura de la mitocondria.

La matriz mitocondrial es rica en proteínas y contiene el ADN mitocondrial (ADNmt) y algunos componentes del ARN, así como las enzimas responsables de las

principales reacciones del metabolismo oxidativo (226-228). Las mitocondrias contienen múltiples copias de su propio ADN; entre 100 y 1000 copias de dicho ADNmt por célula (229). Aunque poseen su propio ADN, las mitocondrias son orgánulos semi-autónomos, puesto que la mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas por el ADN nuclear, siendo sintetizadas en el citosol e importadas a la mitocondria de manera post-transcripcional (227, 230, 231). El número y el tamaño de las mitocondrias presentes en una célula son variables, dependiendo de los requerimientos de la célula que las contiene.

La función principal de la mitocondria es sintetizar a través de la fosforilación oxidativa cerca del 95% del ATP necesario para las células, siendo por tanto responsables de la producción de energía celular (232, 233). A su vez, la mitocondria participa en el mantenimiento de la homeostasis del calcio a nivel intracelular, en la regulación de la apoptosis y en el mantenimiento del potencial de membrana (229, 234). Así mismo, la mitocondria regula la producción de EROs como subproductos de la respiración acoplada al metabolismo oxidativo.

4.2. Dinámica mitocondrial.

Inicialmente, las mitocondrias fueron consideradas orgánulos estáticos y aislados, sin embargo, se ha demostrado que las mitocondrias forman un complejo interconectado y altamente dinámico en el interior de las células (235). Las mitocondrias están sometidas a procesos dinámicos con el fin de establecer un sistema de control

relacionado tanto con la supervivencia o la muerte celular como con la adaptación al entorno metabólico de las células.

4.2.1. Biogénesis mitocondrial.

La biogénesis mitocondrial se define como el crecimiento y la división de mitocondrias ya existentes (236). Es un proceso fundamental para el correcto funcionamiento de la célula y de los procesos de proliferación, mediante los cuales el número de mitocondrias por célula aumenta (236-238).

La biogénesis mitocondrial es un proceso altamente regulado que depende de la actividad de factores mitocondriales y nucleares. De este modo, diversos factores de transcripción nucleares regulan la expresión de genes que codifican proteínas mitocondriales implicadas en el proceso de biogénesis mitocondrial. Los factores de respiración nucleares 1 y 2 (NRF1 y NRF2) constituyen elementos esenciales en el sistema de regulación de la función respiratoria y de la biogénesis mitocondrial, controlando la expresión de proteínas mitocondriales codificadas por el ADN nuclear (239). A su vez, estos factores regulan la expresión de diversos factores de transcripción mitocondriales, entre los que se incluyen el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) y los factores de transcripción mitocondrial B 1 y 2 (TFB1M y TFB2M) (240-242).

Junto con la regulación específica nuclear, la replicación, la transcripción y la traslación del ADNmt desempeñan un papel fundamental en la biogénesis mitocondrial (243). En el interior de la mitocondria, el ADNmt circular se encuentra condensado y empaquetado en complejos multi-proteicos denominados nucleótidos. El TFAM es uno

de los componentes principales de dichos nucleótidos (244-246) y un componente central de la maquinaria de la transcripción (247), regulando también la replicación y el empaquetamiento del ADNmt (244, 248, 249).

Diversos estudios han propuesto que el coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferación de peroxisomas (PGC1 α) podría tener un papel central en la regulación del proceso de biogénesis mitocondrial en numerosas situaciones fisiológicas (239, 250-252). Así, el PGC1 α modula la expresión de algunas proteínas implicadas en el proceso de biogénesis mitocondrial mediante la interacción con NRF1 y NRF2, quienes a su vez promueven la expresión de TFAM (236, 250).

Por otra parte, diversos estudios han demostrado el importante papel que desempeñan las sirtuinas en los procesos de biogénesis y de degradación mitocondrial (253). Concretamente, la sirtuina 1 (SIRT1) actúa desacetilando y por tanto activando proteínas diana como PGC1 α (254) (Figura 6).

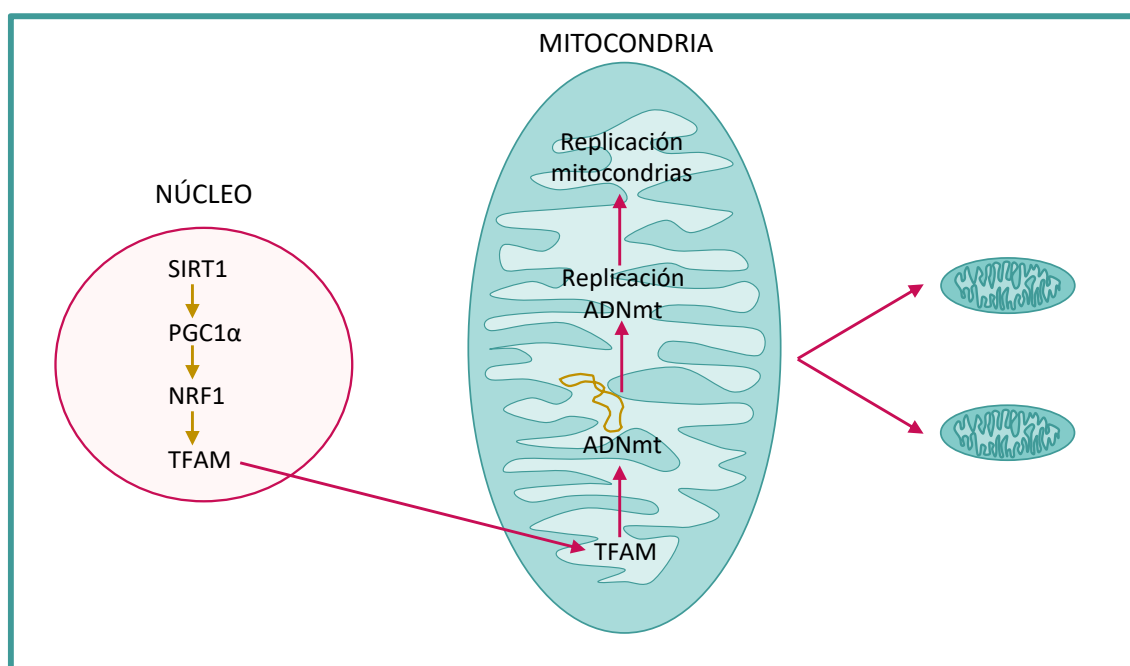


Figura 6. Proceso de biogénesis mitocondrial.

4.2.2. Fusión y fisión mitocondrial.

Las mitocondrias sufren diversos cambios morfológicos con el fin de adaptarse a las demandas energéticas de la célula en condiciones fisiológicas. Estos cambios pueden darse a través de los ciclos continuos de fusión y fisión mitocondrial, también denominados remodelado mitocondrial, que favorecen la correcta distribución, morfología y tamaño de las mitocondrias en la célula, dando lugar a mitocondrias más eficientes (255-258).

Fusión mitocondrial

Los principales reguladores de la fusión mitocondrial son varias proteínas GTPasas de la superfamilia de las dinaminas. Entre ellas se encuentran las proteínas mitofusinas (MFN) y la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1) (259, 260). La fusión mitocondrial es un proceso que consta de dos etapas. En primer lugar, las MFN catalizan la fusión de la membrana mitocondrial externa (261, 262). En segundo lugar, OPA1 induce la fusión de la membrana mitocondrial interna (259, 261, 263). La MFN presenta dos isoformas, MFN1 y MFN2, localizadas en la membrana mitocondrial externa, con sus dominios N-terminal (dominio GTPasa) y C-terminal orientados hacia el citoplasma celular. La MFN1 y la MFN2 forman complejos homo y hetero-oligoméricos que promueven la fusión y la formación de dichos complejos es dependiente de la hidrólisis de GTP y mediada por una región del dominio C-terminal (260). Mientras que las MFN1 y MFN2 interactúan entre sí con el fin de coordinar la fusión de la membrana

mitocondrial externa de mitocondrias adyacentes (262, 264), OPA1 se localiza en el espacio intermembrana asociada a la membrana mitocondrial interna. OPA1 participa en el remodelado de las crestas mitocondriales así como en el acercamiento y la fusión de la membrana mitocondrial interna (265, 266). Las funciones de OPA1 están controladas por el empalme alternativo y la proteólisis de sus distintas isoformas. Se han descrito isoformas largas (L-OPA1) e isoformas cortas (S-OPA1), y en función de las especies y de los diferentes tejidos se han llegado a describir hasta 5 isoformas (267, 268). OPA1 puede ser escindida por dos metaloproteasas diferentes: la proteasa dependiente de ATP Yme1L y la proteasa dependiente del potencial de membrana OMA1 (268, 269). OPA1 presenta dos sitios de escisión proteolítica, S1 y S2 (270) y la proteólisis en estos sitios produce la pérdida del dominio transmembrana de OPA1 y la acumulación de subunidades S-OPA1. La escisión de OPA1 en los sitios S1 y S2 constituye un mecanismo constitutivo necesario para el correcto equilibrio del proceso de fusión mitocondrial y desencadena la acumulación de ambas isoformas, L-OPA1 (forma no clivada) y S-OPA1 (forma corta) (268, 271). S-OPA1 y L-OPA1 dan lugar a complejos oligoméricos que mantienen la estructura de las crestas mitocondriales (272, 273). Condiciones de estrés, tales como un aumento de la apoptosis, impiden la formación de estos complejos y favorecen la escisión de OPA1, observándose un aumento de la conversión de L-OPA1 en S-OPA1 y por tanto una mayor inhibición del proceso de fusión mitocondrial (268, 270, 274-276).

Fisión mitocondrial

La fisión mitocondrial da lugar a dos tipos de mitocondrias, unas con un alto potencial de membrana y otras con un bajo potencial de membrana. Estas últimas, pueden recuperar su potencial de membrana y fusionarse con otras mitocondrias, o permanecer despolarizadas y ser eliminadas mediante mitofagia (255).

El mecanismo de fisión mitocondrial está regulado por la proteína relacionada con la dinamina 1 (DRP1). La DRP1 es una GTPasa citosólica que es reclutada por proteínas receptoras presentes en la membrana mitocondrial externa, entre las que se incluyen la proteína de fisión 1 (FIS 1), el factor de fisión mitocondrial (Mff) y las proteínas de dinámica mitocondrial de 49 (MiD49) y 50 (MiD50) kDa (277-280). Una vez reclutadas, las moléculas de DRP1 forman una estructura de anillo alrededor de la membrana mitocondrial externa y producen una constricción dependiente de GTP de las membranas mitocondriales (235, 281-284).

La figura 7 representa los ciclos de fusión y fisión mitocondrial:

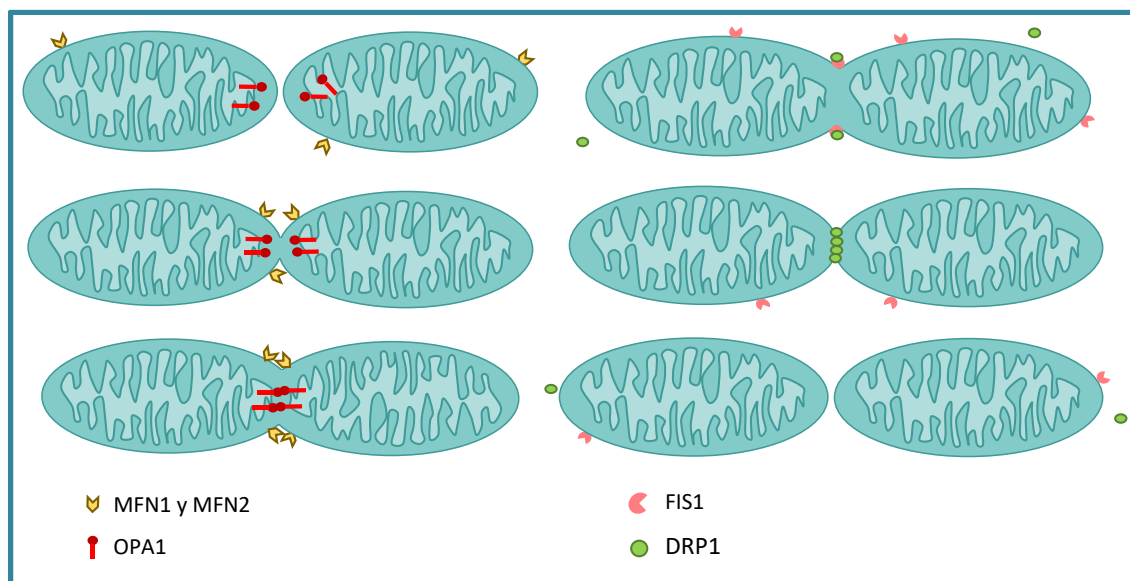


Figura 7. Procesos de fusión y fisión mitocondrial. A) Proceso de fusión de dos mitocondrias regulado por las proteínas MFN1 y MFN2 (fusión de la membrana externa mitocondrial) y OPA1 (responsable de la fusión de la membrana interna de la mitocondria). B) Proceso de fisión regulado por las proteínas DRP1 y FIS1.

4.2.3. Mitofagia.

El mantenimiento de las mitocondrias funcionales es esencial para la supervivencia celular. Las células utilizan el mecanismo de autofagia para eliminar orgánulos dañados y reciclar sus componentes esenciales a través de su encapsulación en una estructura de doble membrana denominada autofagosoma (285). En el caso de las mitocondrias, este mecanismo se denomina mitofagia (286). La importancia de una buena regulación del proceso de mitofagia se debe a que si una mitocondria dañada se fusiona con una mitocondria funcional, el resultado no será un orgánulo funcional de mayor tamaño, sino un orgánulo dañado de mayor tamaño que producirá unos niveles elevados de EROs (287). La fisión mitocondrial, por tanto, desempeña un papel fundamental ya que la mitofagia es precedida por la división mitocondrial, a partir de la

cual se generan fragmentos mitocondriales individuales de tamaño correcto para su encapsulación (288). Con el fin de alcanzar este estado pro-fisión, las proteínas reguladoras de la fusión mitocondrial MFNs, son degradadas a través del sistema ubiquitina proteasoma y OPA1 es degradada mediante OMA1 (289).

Los principales reguladores de la mitofagia, son la quinasa inducida por PTEN1 (PINK1) y la ubiquitina ligasa PARKIN (250, 290). Las mitocondrias disfuncionales sufren despolarización de la membrana, impidiendo el correcto procesamiento proteolítico de PINK1 y desencadenando una acumulación de dicha proteína en la membrana mitocondrial externa así como la fosforilación de sus proteínas diana, entre ellas PARKIN (291, 292). Una vez activada, PARKIN promueve la actividad del sistema ubiquitina proteasoma que permite la degradación de diversas proteínas de la membrana mitocondrial externa tales como las MFN, favoreciendo de esta manera la fragmentación y la posterior mitofagia del orgánulo, y previniendo así la fusión de mitocondrias dañadas con mitocondrias funcionales (288, 290, 293). La figura 8 muestra los procesos comprendidos en la dinámica mitocondrial: la biogénesis mitocondrial, los ciclos de fusión/fisión mitocondrial y la mitofagia.

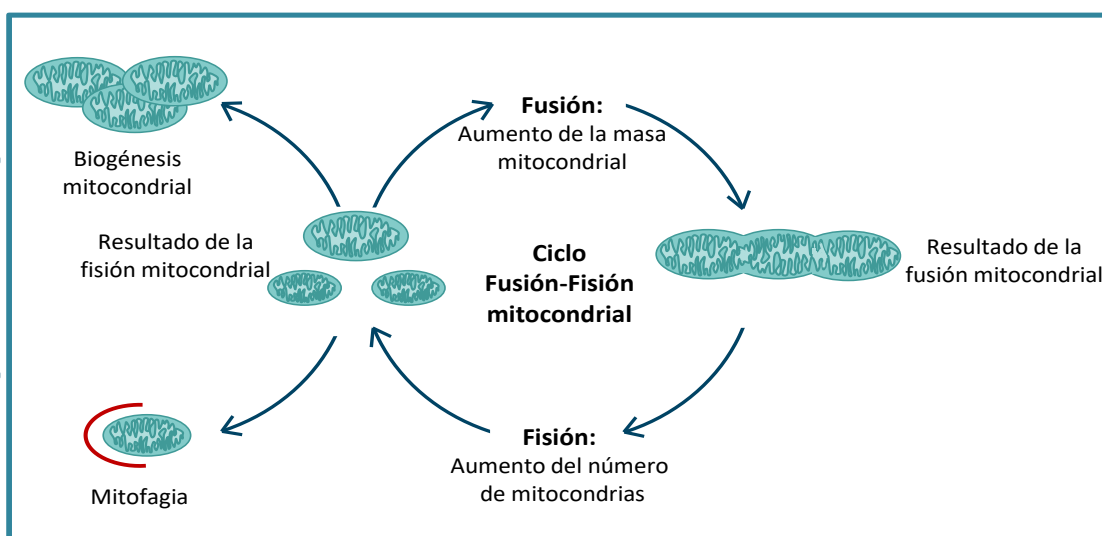


Figura 8. Procesos que componen la dinámica mitocondrial.

4.3. Disfunción mitocondrial.

Las mutaciones en el ADNmt, deleciones y la incorrecta replicación del ADN, constituyen la principal causa de la disfunción mitocondrial (294, 295). La disfunción mitocondrial puede traducirse en diversas alteraciones celulares como la reducción en la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa, la incapacidad de modular la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, la alteración de la homeostasis del calcio y el aumento de la apoptosis (229). A su vez, el estrés y la disfunción mitocondrial pueden afectar a la morfología y a la dinámica mitocondrial. Las mitocondrias sufren continuos ciclos de fusión y fisión con el fin de mantener su integridad y morfología, de esta forma, la acumulación de mitocondrias disfuncionales también puede deberse a cambios en los procesos que componen la dinámica mitocondrial (296).

La disfunción mitocondrial se asocia a un aumento del estrés oxidativo y de la inflamación (297, 298). Así mismo, se han relacionado alteraciones en los procesos de dinámica mitocondrial con patologías como la diabetes (299), la arterosclerosis (300) y la hipertensión (301, 302), lo que sugiere que las alteraciones de la función mitocondrial podrían contribuir a la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares.

Es bien conocido que la disfunción endotelial contribuye al desarrollo de la mayoría de las patologías vasculares. Las CE presentan un bajo contenido en mitocondrias, sin embargo, la dinámica mitocondrial desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del endotelio en condiciones normales. De esta forma, las alteraciones en el proceso de la dinámica mitocondrial participan en el desarrollo de la disfunción endotelial y otras alteraciones vasculares asociadas (303). Se

ha propuesto una posible relación entre la activación del SRAA y el consiguiente aumento del estrés oxidativo con las alteraciones mitocondriales a nivel vascular (253, 304). Concretamente, estudios recientes *in vitro* en podocitos e *in vivo* en tejido glomerular de un modelo experimental realizado en ratones, muestran la posible relación entre la aldosterona y la disfunción mitocondrial a nivel renal. En primer lugar, se expuso el cultivo celular a concentraciones crecientes de aldosterona, resultando en un aumento dosis dependiente de la producción de EROs. La generación de EROs y el daño celular fueron prevenidos con el tratamiento con el inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, rotenona. Por otro lado, la administración de aldosterona resultó en el desarrollo de una pronunciada disfunción mitocondrial a nivel glomerular en el modelo experimental. A su vez, también se observó una reducción en el potencial de membrana mitocondrial y de los niveles de ATP y una disminución del número de copias del ADNmt en el glomérulo de los ratones a los que se les había administrado aldosterona (305). El desarrollo de disfunción mitocondrial a nivel renal se relacionó con un aumento del estrés oxidativo, y con la reducción de la actividad de los complejos I, III y V así como de la expresión de PGC1 α y TFAM a nivel glomerular tras la administración de aldosterona. Estos estudios estarían sugiriendo, por tanto, la participación de la aldosterona en el desarrollo de la disfunción mitocondrial a nivel renal (305, 306).

5. ANTIOXIDANTES NATURALES

Los antioxidantes naturales están ampliamente presentes en los alimentos de origen vegetal. Entre los antioxidantes naturales más importantes destacan, tanto por su ubicuidad como por sus propiedades beneficiosas, los polifenoles (307).

Los polifenoles son un tipo de metabolito secundario que se encuentran de manera natural en las plantas y en los productos que se obtienen de las mismas, incluyendo las frutas, los vegetales, las nueces, el cacao y el té (308, 309). Tradicionalmente, las acciones biológicas de los polifenoles se atribuían exclusivamente a su capacidad antioxidante, sin embargo, en los últimos años se les han atribuido efectos beneficiosos frente al desarrollo de diversas enfermedades como el cáncer y las ECV y neurodegenerativas (308-310). Son numerosos los estudios epidemiológicos tanto nutricionales como clínicos que demuestran que aquellas poblaciones cuya dieta es rica en polifenoles son menos susceptibles de sufrir ECV (311, 312).

5.1. Estructura de los polifenoles.

Los polifenoles constituyen un grupo de compuestos muy amplio y diverso, pudiendo ser clasificados atendiendo a su origen, su función biológica o a su estructura química. Atendiendo a su estructura química, los polifenoles presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos y dobles enlaces conjugados (313, 314). Se encuentran en formas conjugadas principalmente, asociándose con carbohidratos unidos a grupos $\cdot\text{OH}$, aunque también existen enlaces directos del carbohidrato con el grupo fenol. Así mismo, también es común la asociación

con otros compuestos, tales como los ácidos carboxílicos y orgánicos, las aminas, los lípidos e incluso con otros grupos fenoles (315). Los polifenoles ejercen su acción antioxidante gracias a la presencia del anillo fenólico (Figura 9), el cual actúa directamente capturando electrones desapareados de las EROs, generando así especies menos reactivas y neutralizando los radicales libres (316). A su vez, los polifenoles también pueden interferir con los sistemas de detoxificación celular, como la SOD (73), la catalasa o la glutathion peroxidasa (GPX) (317); así como inhibir enzimas generadoras de EROs, como la xantina oxidasa y la NADPHox (313, 318, 319).

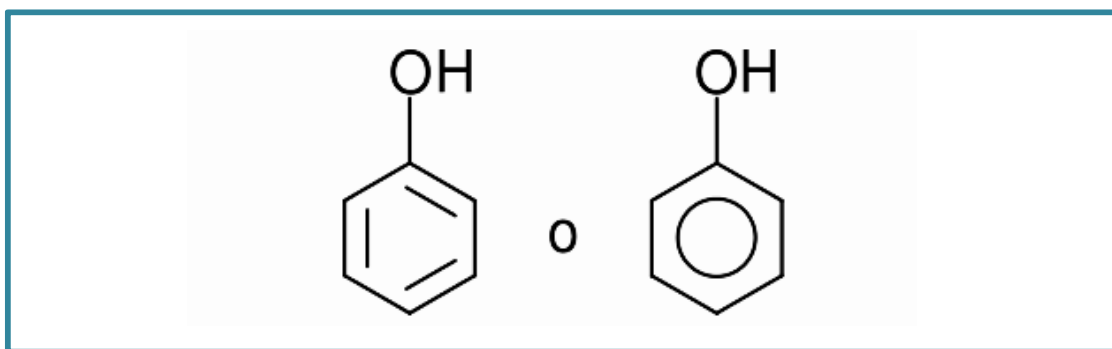


Figura 9. Estructura química del fenol.

5.2. Clasificación de los polifenoles.

Se han aislado y descrito aproximadamente 8000 compuestos distintos, que difieren en su estructura química (320, 321). Las clases y subclases de polifenoles se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides, constituyendo este último la subclase más abundante (313).

5.2.1. Flavonoides.

Los flavonoides constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal, habiéndose identificado hasta 5000 compuestos diferentes (322). Existen varios subgrupos de flavonoides y la clasificación de estos compuestos se hace en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la posición del anillo B. Dentro de cada familia existen una gran variedad de compuestos, que se diferencian entre sí por el número y la posición de los grupos $\cdot\text{OH}$, y por los distintos grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azucares, ácidos orgánicos). Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (catequinas y proantocianidinas) (313, 323).

Los flavonoles más representativos en los alimentos son de tipo flavan-3-ol, y estos pueden aparecer como monómeros de antocianidinas (catequina, epicatequina, galocatequina y epigallocatequina), como dímeros condensados entre sí u oligómeros (procianidinas), o bien pueden aparecer como polímeros (proantocianidinas o taninos condensados).

5.2.2. Proantocianidinas.

Las proantocianidinas son estructuras oligoméricas y poliméricas de monómeros de flavan-3-ol unidos entre sí mediante enlaces carbono-carbono (C-C) desde la posición 4 de un flavanol a la posición 8 del siguiente ($\text{C}_4\text{--C}_8$), y en menor grado a través de la unión $\text{C}_4\text{--C}_6$ (324). Los monómeros que conforman la mayoría de las proantocianidinas existentes son la catequina y la epicatequina (325). Se clasifican por tanto como

proantocianidinas oligoméricas u POCs (formadas por dímeros, trímeros, tetrameros o pentámeros de unidades de flavan-3-ol) y como proantocinidinas poliméricas o PPCs (formadas por seis o más monómeros de unidades de flavan-3-ol).

Las proantocianidinas se diferencian estructuralmente en función de la estequiometría y del patrón de hidroxilación de las unidades de flavan-3-ol que componen la molécula. Los polímeros de proantocianidinas pueden presentar una estructura homogénea constituida por unidades de un único flavanol, como es el caso de las procianidinas (polímeros homogéneos de epicatequina), siendo estas el tipo más abundante en el reino vegetal (324). También pueden presentar una composición mixta a partir de distintas unidades monoméricas, como las propelargonidinas o prodelfinidinas, compuestas a partir de monómeros de epiafcelequina, afcelequina o epigallocatequina (326).

Según el tipo de unión de los monómeros, las proantocianidinas pueden ser además de tipo A o de tipo B (Figura 10). En las de tipo B, las unidades de flavan-3-ol se encuentran unidas entre sí mediante enlaces C-C entre las posiciones C₄-C₆ o C₄-C₈. Las de tipo A presentan una unión adicional entre el carbono C₂ y el hidroxilo del carbono principalmente (324).

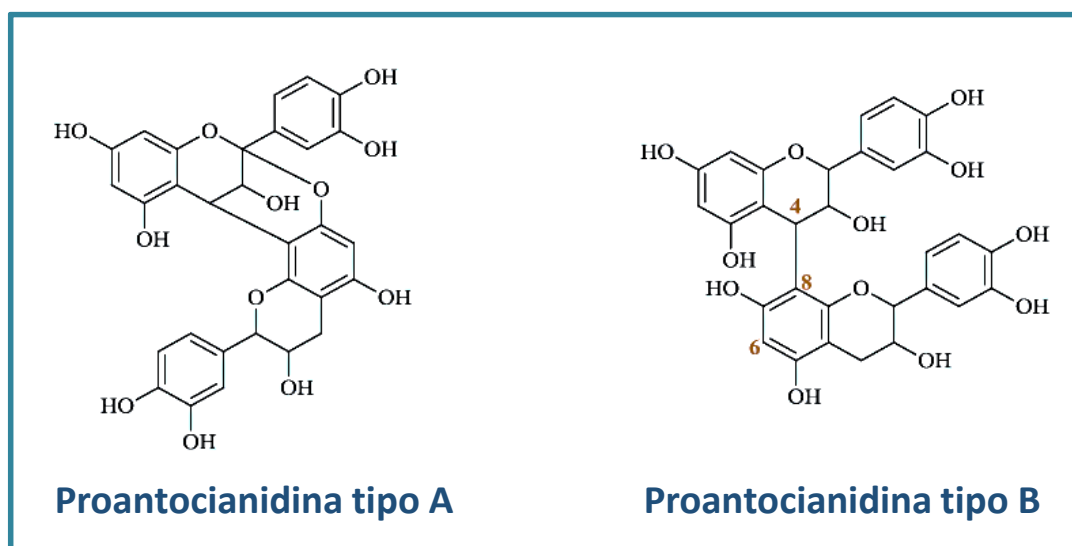


Figura 10. Estructura química de las proantocianidinas en función del tipo de enlace, A o B.

Efectos de las proantocianidinas.

Se han descrito diferentes efectos de las proantocianidinas (325-327).

El **efecto antioxidante** de las proantocianidinas ha sido avalado en numerosos estudios (325, 328, 329). Las proantocianidinas aumentan la expresión y la actividad de varias enzimas antioxidantes, entre ellas la catalasa, la SOD, la GPX y la glutatión-S-transferasa (327). En un modelo *in vitro* con CE de cultivo primario procedentes de aorta bovina se observó que las proantocianidinas incrementaban la liberación de NO dependiente de calcio (330). Por otro lado, también se ha relacionado la administración de proantocianidinas con una disminución de la producción de EROs y con una elevación del ratio de glutatión reducida/glutatión oxidada en modelos *in vivo* de diabetes inducida (329), observándose por tanto un aumento de la capacidad antioxidante de la célula (331).

Las proantocianidinas también desempeñan un **efecto antiinflamatorio** regulando la actividad del factor nuclear NFκB y de la MAPK, modulando de esta forma la expresión de marcadores pro-inflamatorios tales como la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa y diversas citoquinas (332).

También se ha propuesto un **efecto antimicrobiano** de las proantocianidinas debido a su capacidad para inhibir la adhesión bacteriana al tracto urinario (333).

Por otra parte, estudios previos han propuesto que las proantocianidinas podrían poseer **efectos protectores cardiovasculares** (334, 335). Las proantocianidinas presentan propiedades antioxidantes; encargándose de la inhibición de la oxidación de las LDL; y antiinflamatorias, asociándose con una disminución del riesgo cardiovascular, tal y como se ha observado en estudios en pacientes con ECV (336, 337). Estudios en arterias de resistencia de rata han demostrado que las proantocianidinas son capaces de modular la función endotelial (338). Por ejemplo, en CE procedentes de cordón umbilical humano se observó que las proantocianidinas inhibían la agregación plaquetaria (339). También ha sido descrito el efecto antihipertensivo de las proantocianidinas, relacionándose este último con la inhibición de la ECA (340) y con la reducción del estrés oxidativo tal y como se ha observado en un modelo experimental de obesidad (341). Las propiedades antihipertensivas de las proantocianidinas también se han relacionado con la mejora de la función vascular, observándose una mejora de la respuesta vasodilatadora dependiente de NO en individuos control en respuesta al tratamiento con diferentes flavanoles (342).

Mecanismo de acción de las proantocianidinas.

En los últimos años se ha demostrado que las proantocianidinas interaccionan con gran cantidad de dianas moleculares claves en el correcto funcionamiento celular. Entre estas dianas, destacan la vía MAPK/ERK y la actividad de algunas quinasas, como la PKC. Del mismo modo, también se ha propuesto que participan en la activación de factores de transcripción como el peroxisoma proliferador activado del receptor (PPARs), implicados en el metabolismo de los ácidos grasos, o la inhibición de factores de transcripción relacionados con la respuesta inflamatoria y la ECV, como el NF- κ B (332, 343, 344). A su vez, se ha observado que las proantocianidinas podrían ejercer modificaciones de las histonas y metilaciones en el ADN así como modular los microARNs, regulando de esta forma la expresión de diversos genes (327).

Bloqueo del receptor de mineralocorticoides.

Otro de los mecanismos de acción descritos para los efectos beneficiosos de las proantocianidinas es su posible papel como antagonistas del RM.

Un estudio previo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación realizado en un modelo de hipertrofia cardíaca producida por aldosterona en ratas, demostró que el tratamiento con un extracto de proantocianidinas procedentes de piel de almendra mejoraba la función cardíaca y disminuía la expresión de SGK1 así como la expresión del RM en células CV-1 estimuladas con aldosterona (345). Los efectos obtenidos fueron comparables a los obtenidos con el tratamiento con el antagonista del RM, espironolactona. Así mismo, un estudio posterior de nuestro grupo de investigación en

el citado modelo de hipertrofia cardiaca, demostró que la administración de proantocianidinas procedentes de arándano rojo americano resultada en la disminución de la expresión cardiaca de SGK1 así como de diversos mediadores implicados en el transporte de sodio celular (44). Estos resultados, favorecieron la hipótesis de que las proantocianidinas podrían estar ejerciendo sus efectos mediante el bloqueo del RM en el corazón de las ratas a las que se les administró aldosterona.



Hipótesis y Objetivos



1. HIPÓTESIS

Estudios previos de nuestro grupo de investigación, demostraron que en un modelo de hipertrofia cardíaca producida por aldosterona en ratas, el tratamiento con un extracto rico en proantocianidinas mejoraba la función cardíaca y disminuía la expresión de SGK1. Así mismo, se observó que la incubación de células CV-1 con proantocianidinas, disminuía la sobreexpresión del receptor de mineralocorticoides producida por la aldosterona. Estos resultados sugieren que las proantocianidinas podrían antagonizar las acciones asociadas al receptor de mineralocorticoides. En otros estudios, nuestro grupo demostró que las proantocianidinas también disminuían la expresión cardíaca de Nedd4-2 y ENac, regulando el transporte de sodio en las células cardíacas.

Así mismo, diversos estudios han demostrado que la aldosterona modifica los procesos (biogénesis, fusión, fisión, mitofagia) y los mediadores implicados en la dinámica mitocondrial en diversos tipos celulares.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se plantearon las siguientes hipótesis:

1. Las proantocianidinas podrían disminuir las alteraciones vasculares funcionales, estructurales y moleculares producidas por la aldosterona en ratas.
2. Las proantocianidinas podrían regular la expresión vascular de los mediadores implicados en el transporte de sodio.
3. Las proantocianidinas podrían regular la expresión vascular de los procesos y de los mediadores implicados en la dinámica mitocondrial.

2. OBJETIVOS

1. Estudiar las alteraciones vasculares funcionales, estructurales y moleculares producidas por la administración de aldosterona en ratas.
2. Estudiar los efectos de un tratamiento con proantocianidinas sobre las alteraciones vasculares funcionales, estructurales y moleculares producidas por la administración de aldosterona en ratas.
3. Estudiar la expresión de mediadores implicados en el transporte de sodio en la aorta de ratas a las que se les administró aldosterona.
4. Estudiar los efectos de un tratamiento con proantocianidinas sobre la expresión vascular de los mediadores implicados en el transporte celular de sodio.
5. Estudiar la expresión vascular de mediadores implicados en los procesos de dinámica mitocondrial en ratas a las que se les administró aldosterona.
6. Estudiar los efectos de un tratamiento con proantocianidinas sobre la expresión vascular de los mediadores implicados en los procesos de dinámica mitocondrial.



Material y Métodos

1. MODELO EXPERIMENTAL

Se utilizaron ratas macho Wistar (Envigo, Horst, Holanda) con un peso inicial medio de 250 g; mantenidas en condiciones controladas de luz (12:12h luz/oscuridad; 8.00-20.00h/20.00-8.00h), temperatura (20-22°C) y humedad (50-60%). Durante el periodo de evolución los animales tuvieron libre acceso a agua y comida. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las normas de la Universidad Complutense de Madrid y de la Unión Europea para el tratamiento ético de los animales de experimentación (Real Decreto 53/2013).

Tras una primera semana de habituación al entorno, los animales (n=32) se dividieron en cuatro grupos experimentales:

- Grupo control (**CONTROL**): ratas que recibieron una inyección subcutánea diaria del vehículo (0,1 ml aceite de girasol).

- Grupo aldosterona (**ALDO**): ratas que recibieron una dosis diaria de 1500 µg/Kg/día de aldosterona (Sigma Aldrich Química, Madrid, España) disuelta en aceite de girasol mediante inyección subcutánea y 1% de NaCl en el agua de bebida, simultáneamente.

- Grupo proantocianidinas (**P80**): ratas que recibieron una dosis de 5mg/Kg/día de un extracto de arándano rojo americano con una riqueza del 80% en proantocianidinas (Natac Biotech S.L., España) disuelto en el agua de bebida. La composición exacta del extracto se muestra en la tabla 2.

•Grupo aldosterona tratado con proantocianidinas (**ALDO+P80**): ratas a las que se les administró aldosterona (1500 µg/Kg/día) + NaCl 1% y que recibieron una dosis de 5 mg/Kg/día de P80 disuelto en el agua de bebida, simultáneamente.

Composición P80 (%)	
Proantocianidinas	80
Catequinas	6,4
Epicatequinas	4,3
Antocianinas	3,2
Ácido benzoico	2,7
Ácido cinámico	1,8
Maltodextrina	0,9
Pectinas	0,7

Tabla 2. Composición del extracto de proantocianidinas P80.

2. METODOLOGÍA

2.1. Medida de la presión arterial sistólica.

La PAS se determinó de forma indirecta en la cola de los animales mediante un método pletismográfico (Niprem 645, Cibertec, Madrid, España), con las ratas conscientes mantenidas a una temperatura ambiente de 30°C (346).

El procedimiento consistió en la colocación de un manguito con un sensor neumático de pulso en la superficie de la cola del animal y un transductor de presión conectado a un osciloscopio (Narco Biosystems, Houston, Texas, USA). Se realizaron

varias pruebas en días previos para permitir que los animales se habituasen al aparato. Cuando se consideró que las ratas se habían acostumbrado al proceso de medida, de forma que ello no interfiriera en la valoración correcta de este parámetro, se determinó la PAS.

El día de la medición se tomó una media de diez medidas por animal y finalmente se calculó la media aritmética de los valores obtenidos. Las medidas de PAS se tomaron los días 1 y 21 de tratamiento.

2.2. Extracción, preparación y conservación de las muestras.

Después de sacrificar a los animales mediante una inyección intravenosa de pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso corporal) (Pentobarbital sodium salt, Sigma Aldrich Química, Madrid, España) se procedió a la extracción de la aorta torácica de las ratas. A continuación, se dividió en cuatro secciones para su posterior utilización como se representa en la figura 11.

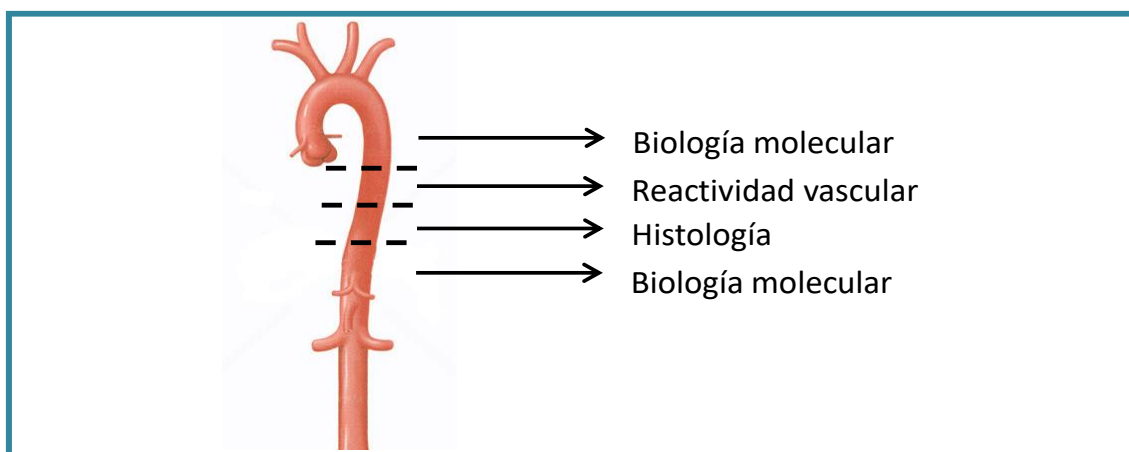


Figura 11. Esquema de las secciones en las que se dividió la aorta torácica para la realización de los diferentes estudios funcionales, histológicos y moleculares.

Cada uno de los fragmentos recogidos se utilizó para realizar los siguientes estudios:

•**Fragmento de aorta torácica superior e inferior:** estudios de biología molecular.

Los fragmentos de aorta se extrajeron en condiciones estériles, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

•**Fragmento de aorta torácica media superior:** ensayos de reactividad vascular.

Los anillos de aorta se aislaron y se sumergieron en solución bicarbonatada de Krebs (composición en mM: NaCl, 118,5; KCl, 4,7; CaCl₂, 2,8; KH₂PO₄, 1,1; NaHCO₃, 25,0; glucosa, 11,1), fría y oxigenada (95% O₂ y 5% CO₂) hasta su montaje en el baño de órganos.

•**Fragmento de aorta torácica media inferior:** estudios histológicos. Los fragmentos de aorta torácica media se recogieron y se almacenaron en formaldehído al 35% (v/v) hasta su posterior utilización.

2.3. Reactividad vascular en anillos de aorta.

El día que se llevaron a cabo los estudios de reactividad vascular, una vez extraída y aislada la aorta torácica, se depositó la misma en una placa Petri con una solución bicarbonatada de Krebs fría (4°C) y oxigenada con una mezcla gaseosa de 95% O₂ y 5% CO₂, donde se eliminó la grasa y el tejido conectivo. A continuación se seccionó en anillos de aproximadamente 3 mm de longitud.

Los anillos aórticos se colocaron en baños de órganos que contenían 5ml de solución de Krebs a una temperatura de 37°C y se montaron entre dos alambres rígidos de acero que se introdujeron por la luz arterial evitando producir estiramientos en el vaso y dañar el endotelio. Uno de los alambres permaneció fijo a la pared del baño y el otro, paralelo al anterior, se conectó a un transductor de fuerza (FT03, Grass, Grass Instruments Co., Quincy, MA, USA) que se encontraba acoplado a un sistema computerizado (Mc Lab 8E, AD Instruments, Milford, MA, USA) con objeto de registrar los cambios desarrollados en la tensión isométrica. El medio de incubación con solución de Krebs se oxigenó de manera continua con una mezcla gaseosa de 95% O₂ y 5% CO₂ con el fin de proporcionar un pH final fisiológico entre 7,4 y 7,6. La figura 12 muestra un esquema representativo del funcionamiento del sistema de reactividad vascular utilizado en el presente estudio.

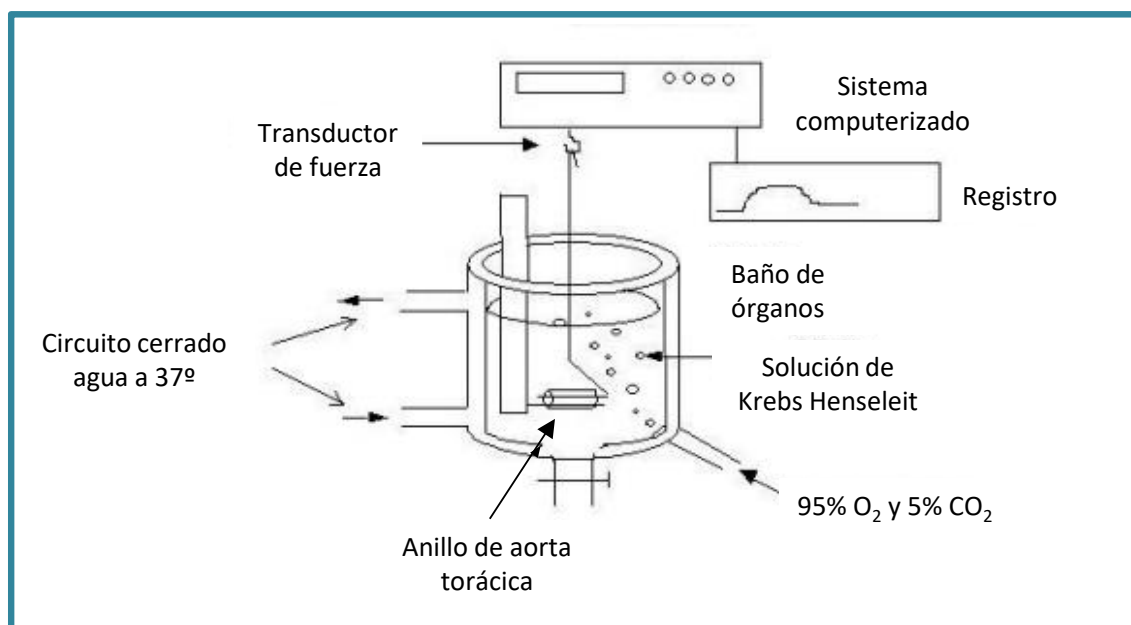


Figura 12. Esquema representativo de un baño de órganos para estudios de reactividad vascular

Los segmentos arteriales se equilibraron a una tensión inicial de 2g durante un periodo de unos 60 minutos aproximadamente, reajustándose a dicha tensión de forma

periódica y cambiándose el medio de incubación a intervalos de 15 minutos. En estudios preliminares se comprobó que esta tensión basal de 2g era la óptima requerida para la expresión de la contracción inducida por cloruro potásico (KCl) en anillos de aorta de rata (347). Se utilizó la contracción a KCl (80 mM) como referencia para expresar la respuesta del resto de factores vasoconstrictores. La presencia de un endotelio funcional se comprobó al final de cada experimento valorando la vasodilatación inducida por 10^{-5} mol/L de ACh (347). Todos los anillos que no presentaron respuesta vasodilatadora a ACh fueron desechados.

2.3.1. Estudio de la respuesta vasoconstrictora.

La respuesta vasoconstrictora independiente de endotelio se valoró mediante la incubación de los anillos aórticos con cloruro potásico (KCl 80 mM), cuya acción es independiente del receptor y está mediada por la despolarización de la membrana celular, produciendo la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje localizados en la membrana. Así mismo, se valoraron las respuestas contráctiles dependientes de receptor inducidas por el agonista $\alpha 1$ -adrenérgico fenilefrina (FE 10^{-9} - 10^{-5} M), valorándose su respuesta contráctil mediante una curva dosis-respuesta, y por angiotensina I y II (AI/AII 10^{-6} M). En el caso de la AI y la AII se valoró su respuesta a una única concentración ya que previamente se ha descrito en la literatura (348) un efecto taquifiláctico, el cual dificulta la realización de una curva dosis-respuesta.

2.3.2. *Estudio de la respuesta vasodilatadora.*

Para valorar la función endotelial se indujo una contracción previa de los anillos aórticos con FE (347) hasta alcanzar una contracción submáxima (entre el 60%-70% de la respuesta máxima) y estable. La dosis de FE utilizada fue determinada para cada animal mediante la realización de una curva dosis-respuesta (FE: 10^9 - 10^5 M). A continuación se realizó una curva dosis-respuesta a ACh (ACh: 10^9 - 10^5 M) para evaluar la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio de los anillos de aorta.

2.4. Estudio histológico de la aorta.

Las muestras de aorta torácica fijadas en formaldehído al 35% fueron posteriormente deshidratadas en un gradiente creciente de etanol (70-90-100%). Posteriormente, se incluyeron en parafina formando bloques para su tallado en secciones de 4 micras de grosor con un microtomo de rotación (Leitz 1512, Imeb Inc., Michigan, USA). A continuación, las secciones obtenidas se tiñeron con rojo picrosirio (Direct red 80, Sigma Aldrich Química, Madrid, España).

2.4.1. *Morfometría de la aorta.*

A partir de los cortes de aorta teñidos, se llevaron a cabo diversas medidas morfométricas con el analizador de imagen LEICA Q 500IW (Leica, Madrid, España). Se

realizaron al menos cinco medidas por cada corte histológico de cada animal. Los parámetros estudiados fueron los siguientes:

- Diámetro de la aorta.
- Diámetro del lumen.
- Área total del corte de aorta.
- Área de la lámina media de la aorta.
- Área del lumen.
- Ratio entre el área de la lámina media y el área del lumen de la aorta.

2.4.2. Contenido de colágeno en la aorta.

Para valorar el contenido de colágeno de la aorta se realizaron un mínimo de 10 fotografías por cada corte teñido con rojo picrosirio mediante una videocámara conectada a un microscopio óptico con un aumento de 40x (Zeiss, Munich, Alemania). Posteriormente se valoró la cantidad de colágeno en las imágenes digitales de los cortes de aorta mediante la relación entre el área teñida de rojo respecto del área total de tejido con el programa Leica application suite (v4,6, Leica Microsystems, Buffalo Grove, Illinois, USA). Los resultados se expresaron como porcentaje del área teñida de rojo picrosirio respecto del grupo control, al que se le asignó el valor del 100%.

2.5. Expresión proteica en aorta mediante western blot.

2.5.1. *Preparación de las muestras.*

Para la extracción de proteínas se pesaron 100 mg de la aorta pulverizada y se añadieron 300µL de tampón de lisis: cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), Tris Base 150mmol/L; NaCl, 50mmol/L; tritón X-100, 1% (vol/vol); fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF, 3mmol/L; y ditiotreitól, DTT, 3mmol/L (Sigma Aldrich Química, Madrid, España). Se homogeneizó el tejido con un homogeneizador automático (Bullet Blender, Next Advance, Inc., Albany, USA) y a continuación las muestras se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 rpm a 4°C. Finalmente, se recogió el sobrenadante donde se encontraban las proteínas totales.

2.5.2. *Cuantificación de proteínas.*

Las proteínas se cuantificaron por medio de una técnica colorimétrica con azul de Coomassie (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) basada en el método de Bradford (347, 349). La lectura de la concentración de proteínas se realizó en un espectrofotómetro (Reader UVM-340, ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austria) a una longitud de onda de 595nm. Una vez valorado el extracto proteico de la aorta, se utilizó una cantidad de muestra equivalente a 40µg de proteína en todos los experimentos sucesivos.

2.5.3. Electroforesis de proteínas.

Las proteínas fueron desnaturalizadas de manera previa a su separación mediante electroforesis, para lo cual se añadió a las mismas un tampón de carga que contenía dodecilsulfato sódico (SDS) (Sigma Aldrich Química, Madrid, España) al 20% como agente desnaturalizante y se calentaron durante 5 minutos a 95°C (Dry bath FB15103, Fischer Scientific, Madrid, España).

Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida-SDS compuestos por un gel concentrador y un gel separador. El porcentaje de acrilamida del gel varió en función de las necesidades de cada experimento y del tamaño de la proteína a analizar. La electroforesis se llevó a cabo bajo condiciones reductoras a un amperaje constante de 50 mA (PowerPac HC High-Current Power Supply, Bio-Rad Laboratories, California, USA).

2.5.4. Transferencia de proteínas.

Tras la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Nitro, Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Se realizó una transferencia semiseca a un voltaje constante de 20V (Transfer-Blot turbo transfer system, Bio-Rad laboratories, CA, USA).

Finalizada la transferencia, con el fin de verificar la calidad de las proteínas y la eficacia del proceso, se realizó una tinción no permanente de la membrana con rojo Ponceau (Sigma Aldrich Química, Madrid, España).

2.5.5. *Inmunodetección de proteínas.*

Previamente a la incubación con anticuerpos específicos, se realizó el bloqueo de todos los sitios de unión inespecífica incubando la membrana durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante con una solución de bloqueo preparada con solución de buffer de fosfato (PBS, con la composición en g/L: NaCl, 8; KCl, 0,2; Na₂HPO₄ 1,44; KH₂PO₄ 0,24) que contenía tween-20 al 0,1% (v/v) (PBST) suplementado con leche en polvo desnatada al 7,5% (p/v).

Una vez eliminado el bloqueo, se incubó la membrana con el correspondiente anticuerpo primario disuelto en PBST suplementado con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) durante 18 horas a 4°C en agitación constante.

Tras esta incubación, se realizaron lavados sucesivos de la membrana en PBST durante 40 minutos y a continuación se añadió el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, frente al anticuerpo primario utilizado en cada caso, disuelto en PBST suplementado con leche en polvo desnatada al 5% (p/v). La membrana se incubó con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante y tras este tiempo se repitieron los lavados en PBST.

El revelado de las muestras se llevó a cabo mediante una técnica basada en el método de detección de la peroxidasa, utilizando el kit de detección quimioluminiscente ECL (Millipore-Bedford, Boston, USA). La detección de quimioluminiscencia y su posterior cuantificación se realizó utilizando el sistema informático GeneGnome5 (Syngene Bio Imaging; Synoptics Ltd. Cambridge, UK). Las proteínas constitutivas β -actina y gapdh se utilizaron como control de carga. Los resultados se expresaron como

de variación frente a los valores del grupo control en unidades densitométricas arbitrarias.

En las tablas 3 y 4 se muestra un resumen de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados y sus correspondientes diluciones.

Anticuerpos primarios			
Anticuerpo	Nombre	Dilución	Referencia
anti-GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	1:10000	D16H11, Cell signaling technology, USA
anti-β-actina	Beta actina	1:10000	A5441, Sigma Aldrich Química, Madrid, España
anti-CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo	1:1000	C4871, Sigma Aldrich Química, Madrid, España
anti-DRP-1	Proteína relacionada con la dinamina 1	1:500	ab56788, Abcam, UK
anti-αENaC	Subunidad alfa del canal epitelial de sodio	1:1000	ab77382, Abcam, UK
anti-βENaC	Subunidad beta del canal epitelial de sodio	1:50	ab2906, Abcam, UK
anti-γENaC	Subunidad gamma del canal epitelial de sodio	1:1000	ab3468, Abcam, UK
anti-eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial	1:250	ab95254, Abcam, UK
anti-MFN1	Mitofusina 1	1:500	ab57602, Abcam, UK
anti-Nedd4-2	Ubiquitina ligasa E3	1:1000	ab46521, Abcam, UK
anti-NRF1	Factor respiratorio nuclear 1	1:500	ab175932, Abcam, UK
anti-OMA1	Metaloendopeptidasa mitocondrial 1	1:500	ab104316, Abcam, UK
anti-OPA1	Proteína de atrofia óptica 1	1:1000	612607, BD Biosciences, USA
anti-p-eNOS^{Ser1177}	Óxido nítrico sintasa endotelial fosforilada	1:1000	9571, Cell signaling technology, USA
anti-pNedd4-2	Ubiquitina ligasa E3 fosforilada	1:1000	ab168349, Abcam, UK
anti-p22phox	Subunidad p22phox de la NADH oxidasa	1:500	sc-20781, Santa Cruz Biotechnology, Germany
anti-PGC1α	Coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferación de peroxisomas	1:250	ab106814, Abcam, UK
Anti-PINK1	Quinasa inducida por PTEN 1	1:750	ab23707, Abcam, UK
anti-SGK1	Quinasa regulada por suero y glucocorticoides	1:500	07-315, EMD Millipore, USA
anti-SIRT1	Sirtuína 1	1:500	ab110304, Abcam, UK

Anticuerpo	Nombre	Dilución	Referencia
anti-SOD2	Superóxido dismutasa 2	1:2500	ab13533, Abcam, UK
anti-TFAM	Factor de transcripción mitocondrial A	1:1000	ab131607, Abcam, UK
anti-TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa	1:1000	ab34674, Abcam, UK

Tabla 3. Anticuerpos primarios empleados para la detección de las proteínas estudiadas.

Anticuerpos secundarios		
Anticuerpo	Dilución	Referencia
anti-Ig G de ratón	Variables	NA931, GE Healthcare, UK
anti-Ig G de conejo	Variables	NA934, GE Healthcare, UK
anti-Ig G de cabra	Variables	Sc-2020, Santa Cruz Biotechnology, Germany

Tabla 4. Anticuerpos secundarios empleados para la detección de las proteínas estudiadas. Las condiciones de los anticuerpos secundarios se determinaron según las necesidades del estudio.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresaron como media \pm el error estándar de la media (SEM). Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó un test de análisis de la varianza de una vía o ANOVA, seguido del test de análisis múltiple Newman-Keuls en caso de haber diferencias significativas.

Las curvas dosis-respuesta realizadas en el estudio de reactividad vascular se compararon mediante un análisis multivariable de la varianza para medidas repetidas (MANOVA), seguido también por un test de Newman-Keuls en caso de existir diferencias

significativas. Las respuestas de vasoconstricción se expresaron como porcentaje de contracción en función de la respuesta a 80mM de KCl y las respuestas de vasodilatación como porcentaje de reducción de tensión en anillos pre-contraídos con FE. Un p-valor obtenido menor de 0,05 se consideró significativo. Todos los análisis y gráficas se realizaron utilizando el programa Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software Inc. CA, USA).



Resultados

1. Efecto del tratamiento con P80 sobre la presión arterial sistólica en ratas a las que se les administró aldosterona.

La figura 13 muestra los valores de la PAS de los grupos estudiados al finalizar el tratamiento. La aldosterona produjo un aumento ($p<0,05$) de la PAS en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL. La PAS disminuyó ($p<0,05$) en el grupo ALDO+P80 en comparación con el grupo ALDO, observándose valores similares a los del grupo CONTROL. No se observaron diferencias significativas entre los valores de la PAS de los grupos CONTROL y P80 (Figura 13).

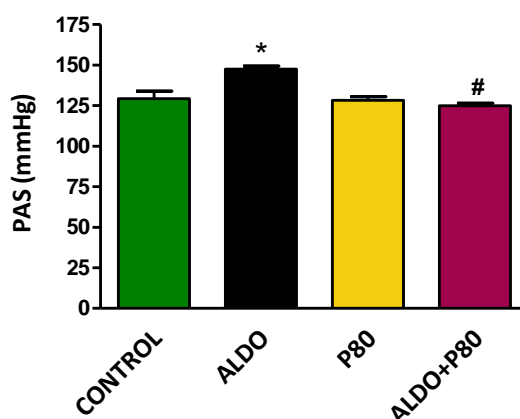


Figura 13. PAS en los grupos: Control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80). * $p<0,05$ vs CONTROL; # $p<0,05$ vs ALDO.

2. Efecto del tratamiento con P80 sobre la reactividad vascular en anillos de aorta de ratas a las que se les administró aldosterona.

2.1. Respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio.

La relajación inducida por la ACh en los anillos de aorta de las ratas del grupo ALDO fue menor ($p<0,05$) a dosis intermedias que en los anillos aórticos de los animales CONTROL, aunque no llegó a modificarse la respuesta máxima. Los anillos de aorta pertenecientes a los animales del grupo ALDO+P80 presentaron una mayor ($p<0,05$) respuesta vasodilatadora a dosis intermedias de ACh que el grupo ALDO, observándose valores similares a los valores CONTROL. No se observaron diferencias significativas en la relajación dosis dependiente inducida por la ACh entre los grupos CONTROL y P80 (Figura 14).

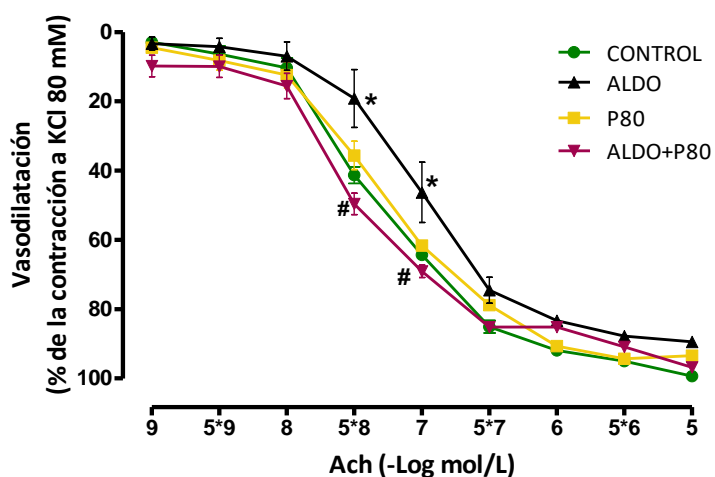


Figura 14. Relajación inducida por la ACh en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80) en anillos de aorta. * $p<0,05$ vs CONTROL; # $p<0,05$ vs ALDO.

2.2. Respuesta vasoconstrictora independiente de endotelio.

No se observaron diferencias en la respuesta vasoconstrictora de los anillos de aorta inducida por KCl en ninguno de los grupos experimentales estudiados (Figura 15).

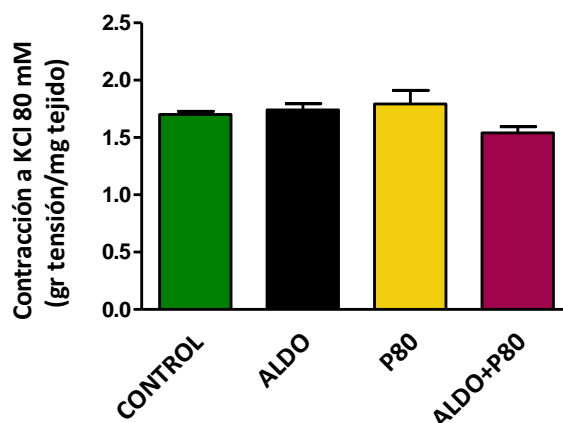


Figura 15. Contracción inducida por KCl en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80) en anillos de aorta. * $p < 0,05$ vs CONTROL; # $p < 0,05$ vs ALDO.

No se observaron diferencias significativas en la respuesta vasoconstrictora inducida por la AI en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL. Asimismo, no se apreciaron diferencias en la respuesta vasoconstrictora de los anillos del grupo ALDO+P80 con respecto al grupo ALDO. Los anillos aórticos de los animales del grupo P80 presentaron una menor ($p < 0,05$) respuesta vasoconstrictora a la AI en comparación con los anillos de los animales CONTROL (Figura 16A).

La respuesta vasoconstrictora a la AI aumentó ($p < 0,05$) en los anillos aórticos del grupo ALDO con respecto a los anillos del grupo CONTROL. Asimismo, se observó una menor ($p < 0,05$) respuesta vasoconstrictora en los anillos de aorta del grupo ALDO+P80

en comparación con el grupo ALDO. Por último, la respuesta vasoconstrictora a la AI de los anillos de aorta del grupo P80 fue menor ($p<0,05$) con respecto al grupo CONTROL (Figura 16B).

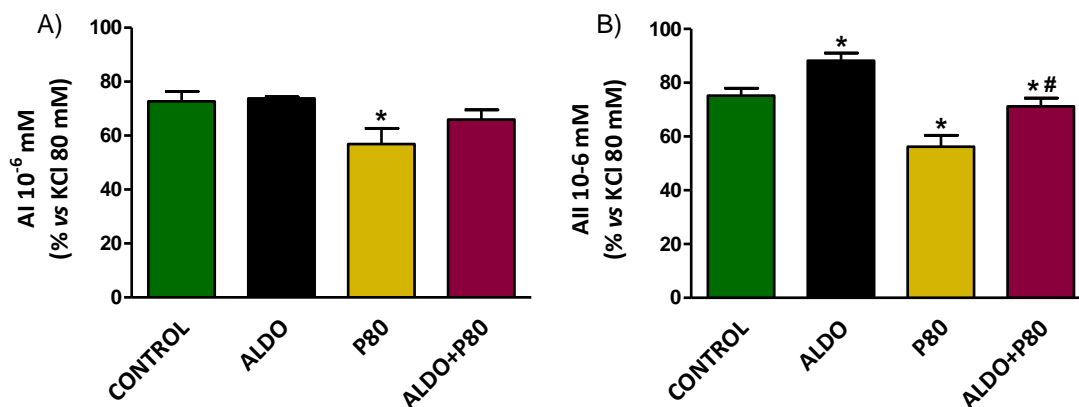


Figura 16. Contracción inducida por: A) AI y B) AII en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80) en anillos de aorta. * $p<0,05$ vs CONTROL; # $p<0,05$ vs ALDO.

La respuesta dosis dependiente a FE fue comparable en los animales de los grupos CONTROL y ALDO. Sin embargo, la respuesta vasoconstrictora de los anillos aórticos a la FE fue menor ($p<0,05$) en el grupo ALDO+P80 en comparación con los grupos CONTROL y ALDO. La respuesta vasoconstrictora a la FE disminuyó ($p<0,05$) en el grupo P80 en comparación con el grupo CONTROL (Figura 17).

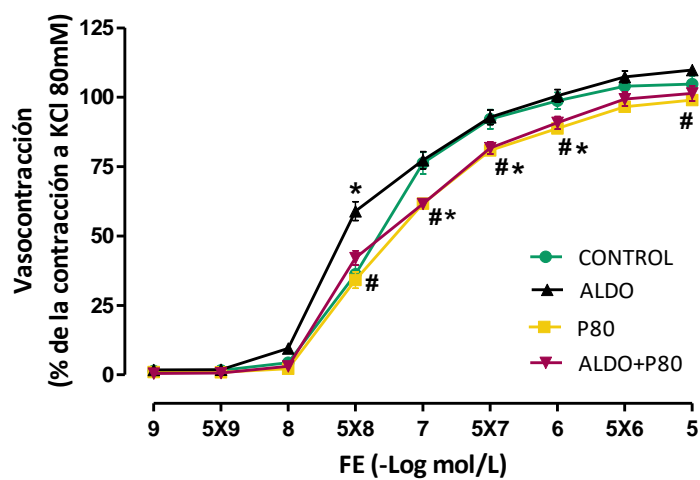


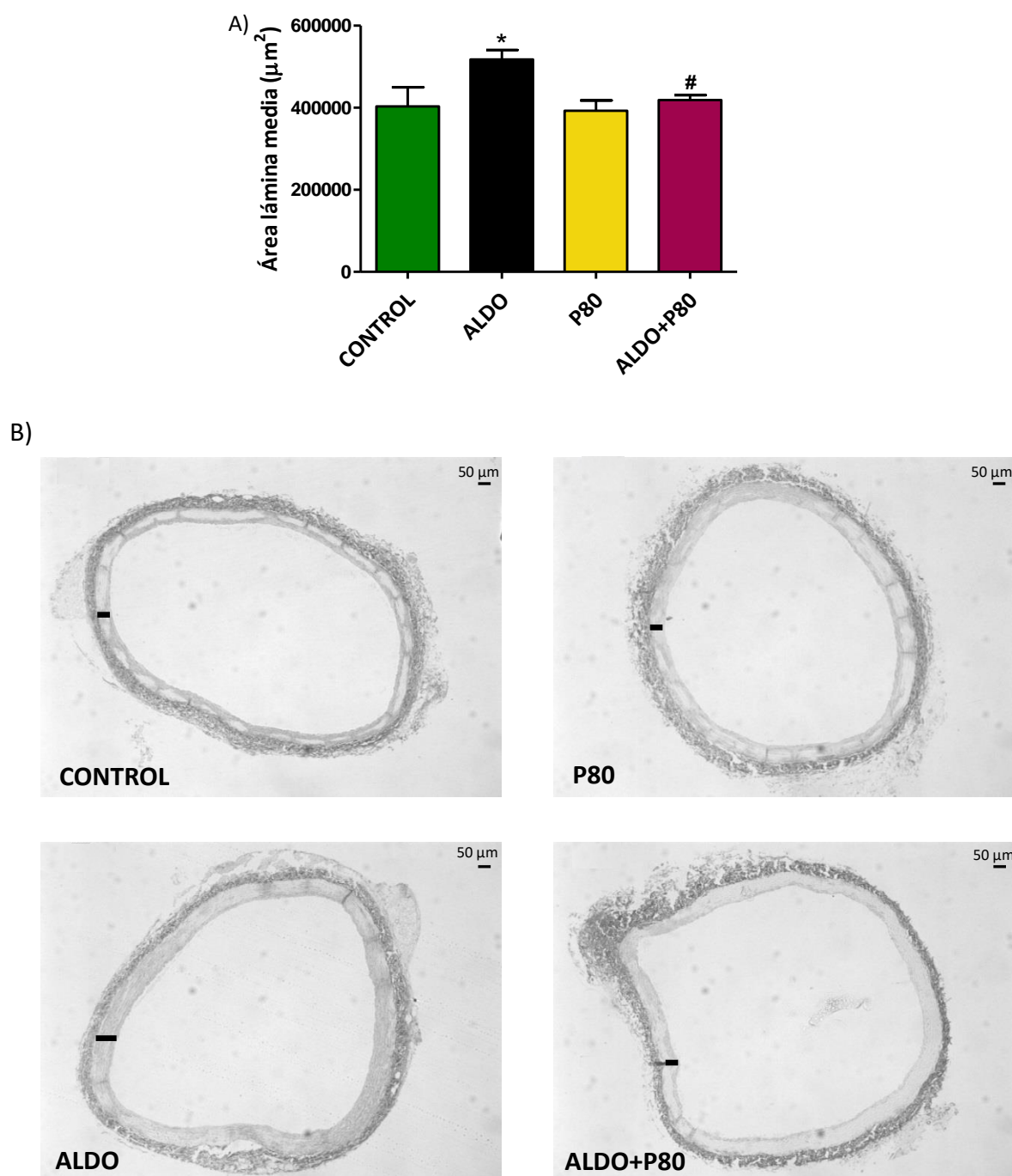
Figura 17. Contracción inducida por FE en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80) en anillos de aorta. * $p < 0,05$ vs CONTROL; # $p < 0,05$ vs ALDO.

3. Efecto del tratamiento con P80 sobre las alteraciones estructurales vasculares en ratas a las que se les administró aldosterona.

3.1. Análisis morfológico.

El área de la lámina media de la aorta aumentó ($p<0,05$) en los animales ALDO con respecto a los animales CONTROL. Los animales pertenecientes al grupo ALDO+P80 presentaron un área de la lámina media disminuida ($p<0,05$) en comparación con el grupo ALDO, observándose valores muy similares a los del grupo CONTROL. No se apreciaron diferencias significativas en el área de la lámina media entre los grupos P80 y CONTROL (Figura 18A).

La figura 18B muestra microfotografías representativas de cada uno de los grupos estudiados en las cuales se puede observar la estructura del vaso, pudiéndose apreciar un aumento del área de la lámina media en el grupo ALDO en comparación con el grupo CONTROL. Dicho aumento fue normalizado ($p<0,05$) en el grupo ALDO+P80 con respecto al grupo CONTROL. Asimismo, no se observan diferencias significativas en el área de la lámina media entre los grupos P80 y CONTROL (Figura 18B).



No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales en el resto de parámetros morfológicos analizados (Tabla 5).

	CT	ALDO	P80	ALDO+P80
Diámetro vaso (μm)	1557,81	1519,43	1565,67	1528,62
Diámetro lumen (μm)	1421,34	1300,32	1402,00	1437,95
Área total vaso (μm^2)	1937231,28	1888242,49	1986563,78	1950798,20
Área lumen (μm^2)	1588260,62	1331085,40	1535220,98	1504225,37
Ratio A. LM/A. L	0,2273	0,3221	0,2882	0,2914

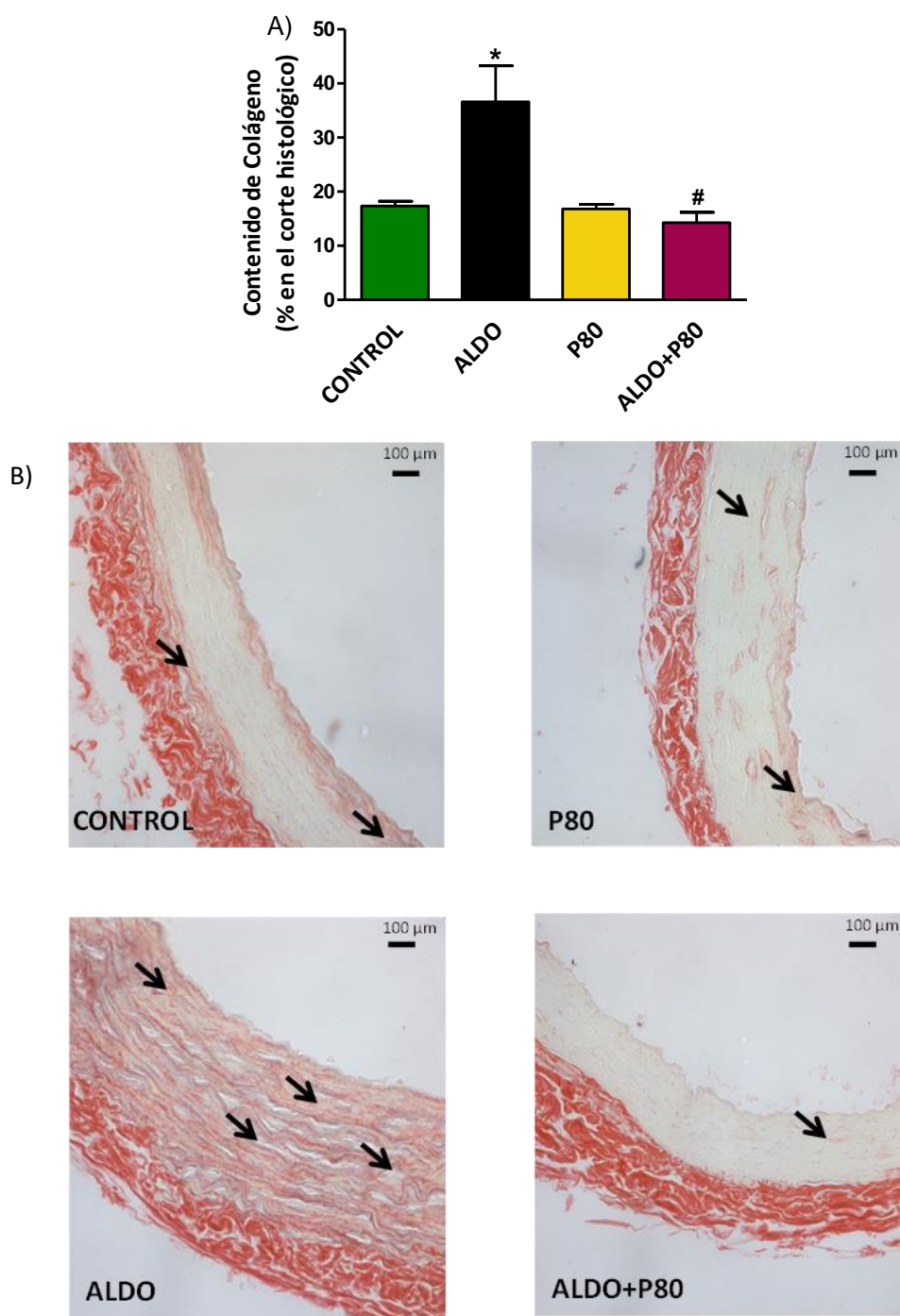
Tabla 5. Diámetro del vaso, diámetro del lumen, área total del vaso, área de la lámina media y área del lumen en cortes histológicos de aorta de los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80). * $p < 0,05$ vs CONTROL; # $p < 0,05$ vs ALDO. (A. LM: área de la lámina media; A. L: área del lumen).

3.2 Contenido de colágeno de la aorta.

El contenido de colágeno aumentó ($p < 0,05$) a nivel vascular en las ratas del grupo ALDO en comparación con las ratas del grupo CONTROL. Los animales del grupo ALDO+P80 presentaron un contenido de colágeno de la aorta menor ($p < 0,05$) con respecto al grupo ALDO, hasta alcanzar valores similares a los del grupo CONTROL. No se observaron diferencias significativas en el contenido de colágeno entre los grupos CONTROL y P80 (Figura 19A).

La figura 19B muestra microfotografías de la sección transversal de la aorta representativas de cada uno de los grupos estudiados. Se aprecian los acúmulos de colágeno en la lámina media de la aorta como zonas teñidas de rojo. En el grupo ALDO se observa la lámina media engrosada y con un mayor número de fibras de colágeno con respecto al grupo CONTROL. En la microfotografía perteneciente al grupo ALDO+P80 se puede observar una disminución marcada del contenido de fibras de colágeno con respecto al grupo ALDO, apreciándose una lámina media similar a la de los animales

CONTROL. No se observan diferencias significativas en el contenido de colágeno de la lámina media entre los grupos CONTROL y P80 (Figura 19B).



3.3. Expresión proteica del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF).

La expresión proteica del mediador de fibrosis CTGF en la aorta fue mayor ($p<0,05$) en los animales del grupo ALDO en comparación con los animales CONTROL. Dicho aumento del marcador disminuyó ($p<0,05$) en el grupo ALDO+P80 con respecto al grupo ALDO. Asimismo, se observó una disminución ($p<0,05$) de la expresión del marcador CTGF en el grupo P80 con respecto al grupo CONTROL (Figura 20).

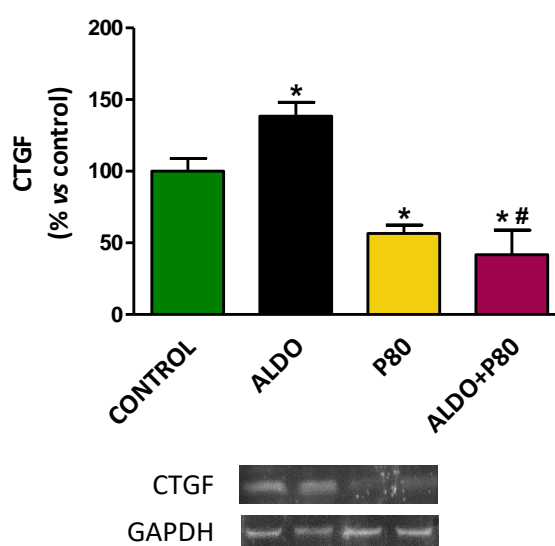


Figura 20. Expresión proteica del CTGF en la aorta de los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80). * $p<0,05$ vs CONTROL; # $p<0,05$ vs ALDO.

4. Efecto del tratamiento con P80 sobre la inflamación, la oxidación y la eNOS vascular en ratas a las que se les administró aldosterona.

4.1. Inflamación: expresión proteica del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).

Los niveles de expresión proteica del marcador de inflamación TNF α aumentaron ($p < 0,05$) en la aorta de los animales del grupo ALDO con respecto a los animales del grupo CONTROL. La expresión proteica de dicho marcador fue menor ($p < 0,05$) en el grupo ALDO+P80 en comparación con el grupo ALDO. No se observaron diferencias significativas en el marcador de inflamación entre los grupos CONTROL y P80 (Figura 21).

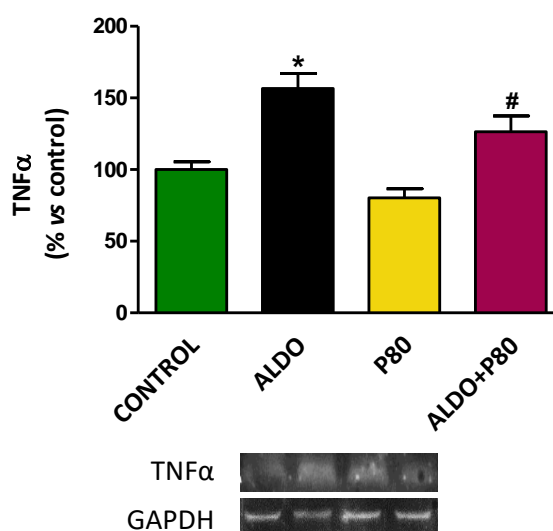


Figura 21. Expresión proteica del TNF α en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80). * $p < 0,05$ vs CONTROL; # $p < 0,05$ vs ALDO.

4.2. Oxidación: expresión proteica de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa (p22phox).

Los valores de expresión proteica de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa aumentaron ($p<0,05$) en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL, y disminuyeron ($p<0,05$) en los animales ALDO+P80. No se observaron diferencias significativas en los niveles de la subunidad p22phox de los grupos CONTROL y P80 (Figura 22).

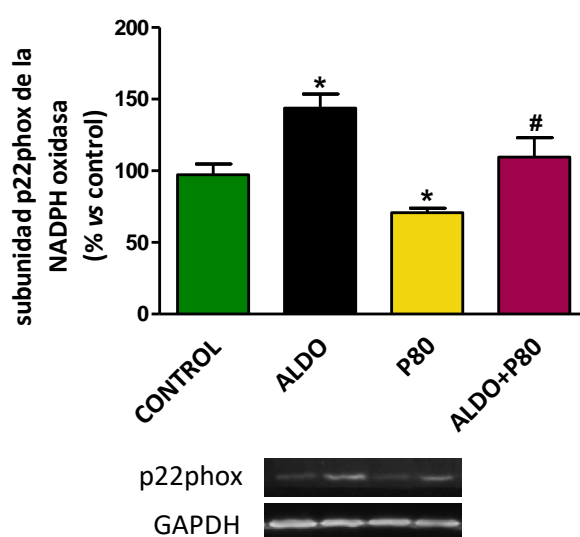


Figura 22. Expresión proteica de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80). * $p<0,05$ vs CONTROL; # $p<0,05$ vs ALDO.

4.3. Expresión proteica de la óxido nítrico sintasa endotelial y su fosforilación en el residuo de serina 1177 (eNOS y p-eNOS^{Ser1177}).

Se observó una disminución ($p<0,05$) de la expresión proteica de eNOS y de p-eNOS^{Ser1177} vascular en los animales del grupo ALDO en comparación con los animales

CONTROL. La disminución de la expresión proteica tanto de eNOS como de p-eNOS^{Ser1177} fue bloqueada ($p<0,05$) en el grupo ALDO+P80 con respecto al grupo ALDO, hasta observarse valores similares a los del grupo CONTROL (Figura 23). No se observaron diferencias significativas en la expresión proteica de eNOS ni de p-eNOS^{Ser1177} entre los grupos CONTROL y P80 (Figura 23).

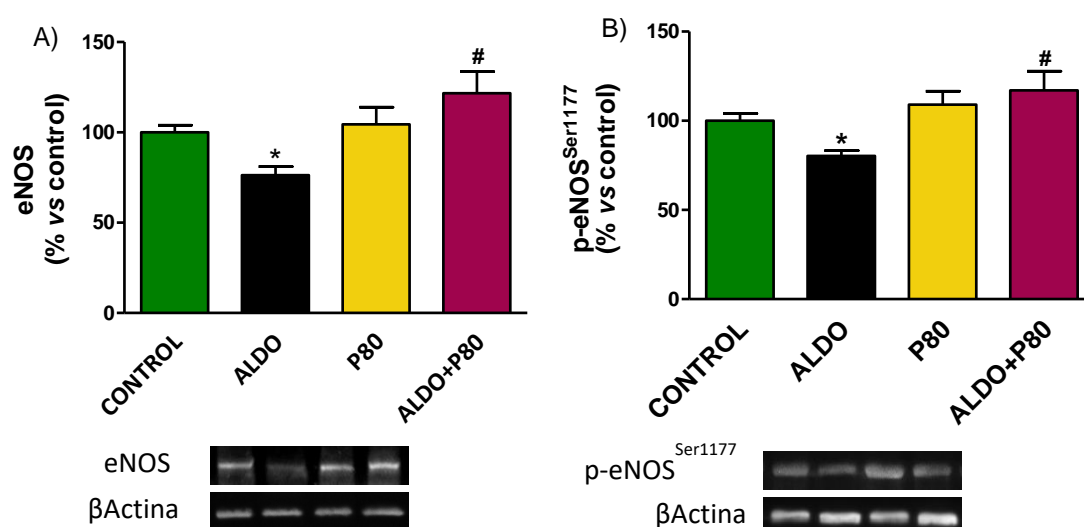


Figura 23. Expresión proteica de A) eNOS y B) p-eNOS^{Ser1177} en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80).

* $p<0,05$ vs CONTROL; # $p<0,05$ vs ALDO.

5. Efecto del tratamiento con P80 sobre los mediadores implicados en el transporte de sodio vascular en ratas a las que se les administró aldosterona.

5.1. Expresión proteica de la quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1 (SGK1).

La administración de aldosterona produjo un aumento ($p<0,05$) de la expresión proteica de SGK1 en la aorta de las ratas del grupo ALDO en comparación con los valores de las ratas CONTROL. Dicho aumento fue bloqueado ($p<0,05$) en el grupo ALDO+P80 con respecto al grupo ALDO, alcanzando valores inferiores a los valores del grupo CONTROL. Asimismo, se observó una disminución ($p<0,05$) de la expresión de SGK1 en grupo P80 en comparación con los animales CONTROL (Figura 24).

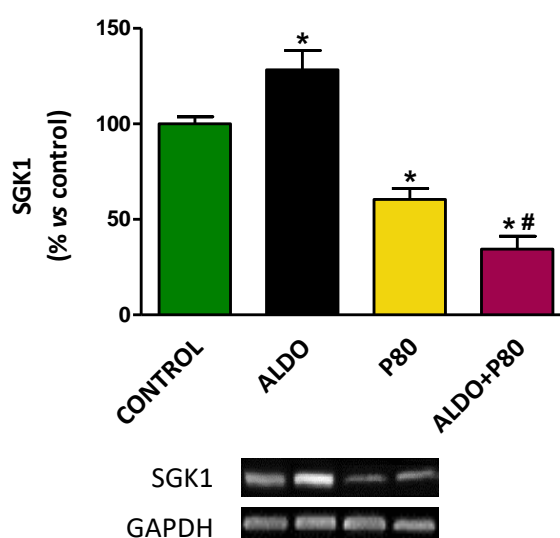


Figura 24. Expresión proteica de SGK1 en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80). * $p<0,05$ vs CONTROL; # $p<0,05$ vs ALDO.

5.2. Expresión proteica de las tres subunidades (α , β y γ) del canal epitelial de sodio (ENaC).

Los niveles de las tres subunidades α , β y γ de ENaC aumentaron ($p<0,05$) en el grupo ALDO en comparación con el grupo CONTROL. El aumento de la expresión de las tres subunidades de ENaC fue normalizado ($p<0,05$) en el grupo ALDO+P80 con respecto al grupo ALDO. No se observaron diferencias significativas en la expresión proteica de las subunidades α y γ de ENaC entre los grupos CONTROL y P80. Por el contrario, sí se observó una disminución ($p<0,05$) de la expresión de la subunidad β de ENaC en el grupo P80 en comparación con el grupo CONTROL (Figura 25).

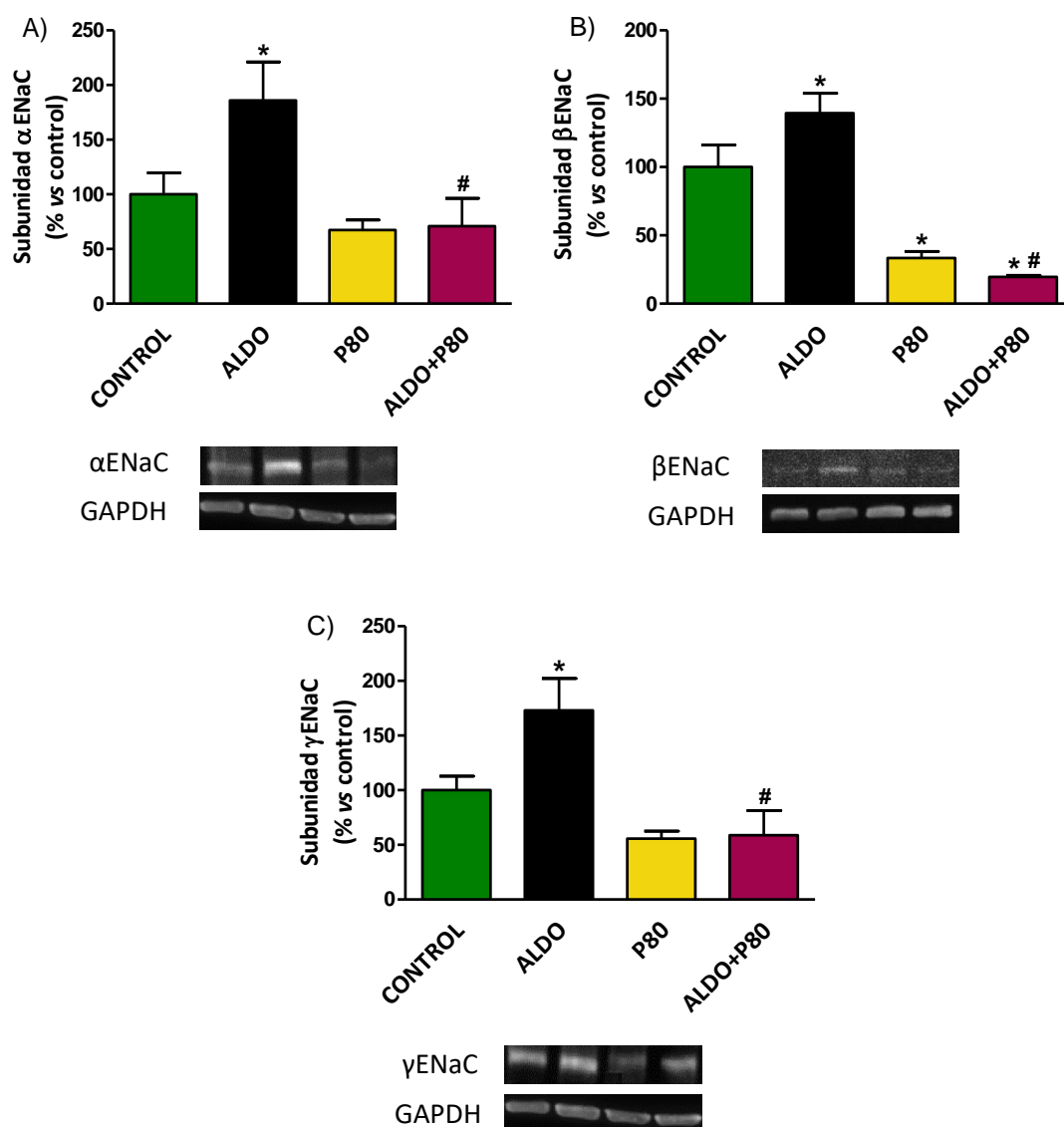


Figura 25. Expresión proteica de las tres subunidades de ENaC: A) α , B) β y C) γ en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80). * $p < 0,05$ vs CONTROL; # $p < 0,05$ vs ALDO.

5.3. Expresión proteica de la ubiquitina ligasa E3 y su forma fosforilada (Nedd4-2 y pNedd4-2).

La expresión de Nedd4-2 disminuyó ($p<0,05$) en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL. Los animales del grupo ALDO+P80 presentaron unos niveles de Nedd4-2 aumentados ($p<0,05$) en comparación con los animales pertenecientes al grupo ALDO (Figura 26A).

Por otra parte, la expresión de la forma fosforilada de Nedd4-2, pNedd4-2, aumentó ($p<0,05$) en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL. Dicho aumento fue bloqueado ($p<0,05$) en el grupo ALDO+P80, hasta valores normalizados en comparación con el grupo ALDO (Figura 26B).

No se observaron diferencias significativas en la expresión de Nedd4-2 y pNedd4-2 entre los grupos CONTROL y P80 (Figura 26).

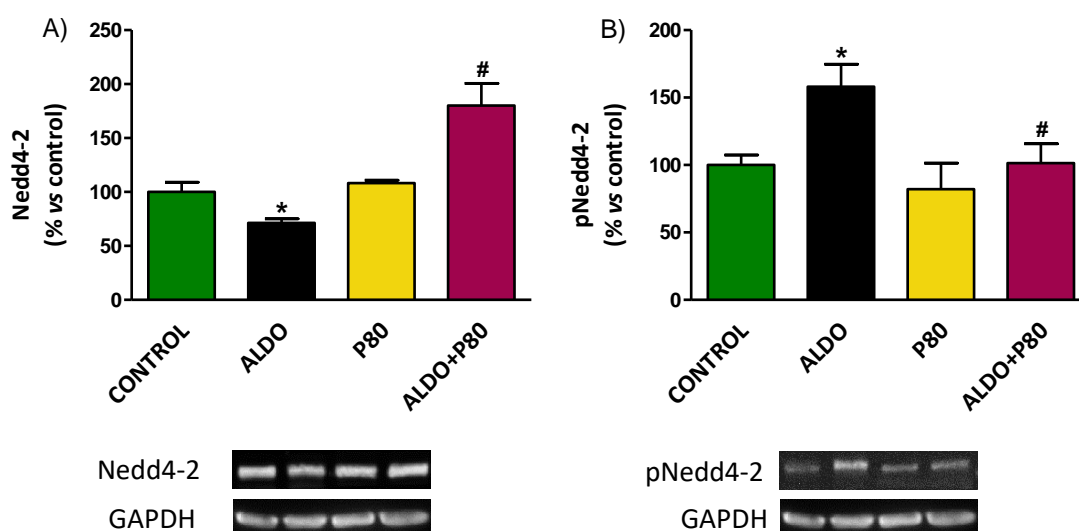


Figura 26. Expresión proteica de A) Nedd4-2 y B) pNedd4-2 en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80).

* $p<0,05$ vs CONTROL; # $p<0,05$ vs ALDO.

6. Efecto del tratamiento con P80 sobre las alteraciones mitocondriales vasculares en ratas a las que se les administró aldosterona.

6.1. Biogénesis mitocondrial.

6.1.1. Expresión proteica de la sirtuína-1 (SIRT1).

La expresión proteica vascular de SIRT1 disminuyó ($p<0,05$) en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL. El grupo ALDO+P80 presentó una normalización ($p<0,05$) de los valores de SIRT1 en aorta con respecto al grupo ALDO. No se observaron diferencias significativas en la expresión proteica de SIRT1 entre los grupos CONTROL y P80 (Figura 27).

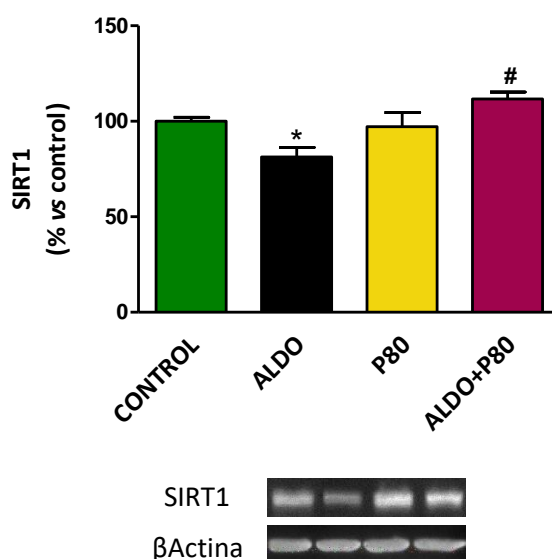


Figura 27. Expresión proteica de SIRT1 en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80). * $p<0,05$ vs CONTROL; # $p<0,05$ vs ALDO.

6.1.2. Expresión proteica del coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferación de peroxisomas (PGC1 α).

La expresión proteica de PGC1 α fue menor ($p<0,05$) en la aorta de los animales pertenecientes al grupo ALDO en comparación con los animales CONTROL. La disminución ($p<0,05$) de la expresión proteica de este factor fue prevenida en el grupo ALDO+P80 con respecto al grupo ALDO. No se observaron diferencias significativas en la expresión de PGC1 α entre los grupos CONTROL y P80 (Figura 28).

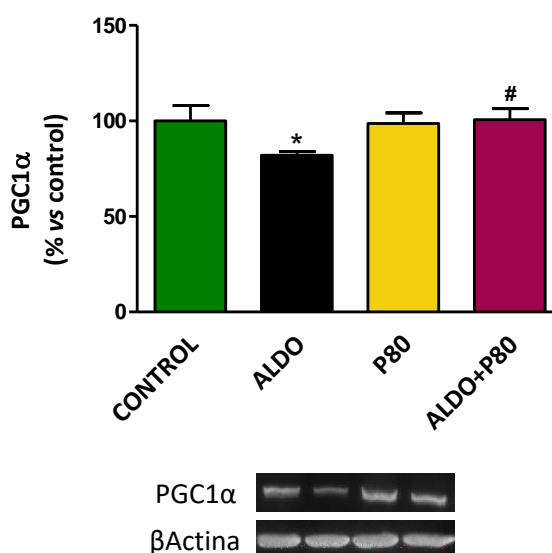


Figura 28. Expresión proteica de PGC1 α en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80). * $p<0,05$ vs CONTROL; # $p<0,05$ vs ALDO.

6.1.3. Expresión proteica del factor respiratorio nuclear 1 (NRF1).

No se observaron diferencias significativas en la expresión de NRF1 entre los grupos experimentales estudiados (Figura 29).

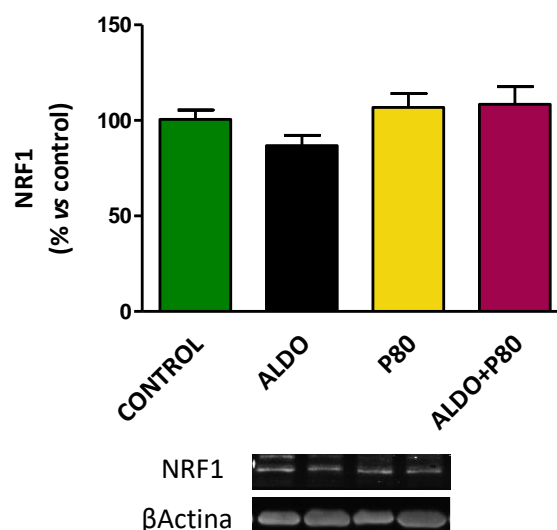


Figura 29. Expresión proteica de NRF1 en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80). * $p < 0,05$ vs CONTROL; # $p < 0,05$ vs ALDO.

6.1.4. Expresión proteica del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM).

La expresión proteica vascular del TFAM disminuyó ($p < 0,05$) en los animales del grupo ALDO con respecto a los animales CONTROL. Se observaron valores de expresión del TFAM aumentados ($p < 0,05$) en la aorta de los animales pertenecientes al grupo ALDO+P80 en comparación con los animales de los grupos ALDO y CONTROL. No se observaron diferencias significativas en la expresión proteica del TFAM entre los grupos CONTROL y P80 (Figura 30).

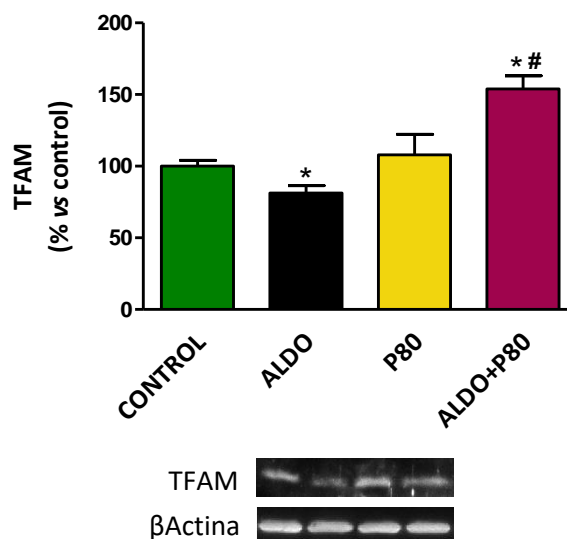


Figura 30. Expresión proteica del TFAM en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80). * $p < 0,05$ vs CONTROL; # $p < 0,05$ vs ALDO.

6.2. Remodelado mitocondrial (fusión / fisión).

6.2.1. *Expresión proteica de la metaloentopeptidasa mitocondrial 1 (OMA1).*

Se apreció un aumento ($p < 0,05$) de la expresión proteica de OMA1 en el grupo ALDO con respecto del grupo CONTROL. Los animales del grupo ALDO+P80 presentaron una disminución ($p < 0,05$) de los niveles de OMA1 con respecto a los animales del grupo ALDO. No se observaron diferencias significativas en la expresión proteica de OMA1 entre los grupos CONTROL y P80 (Figura 31).

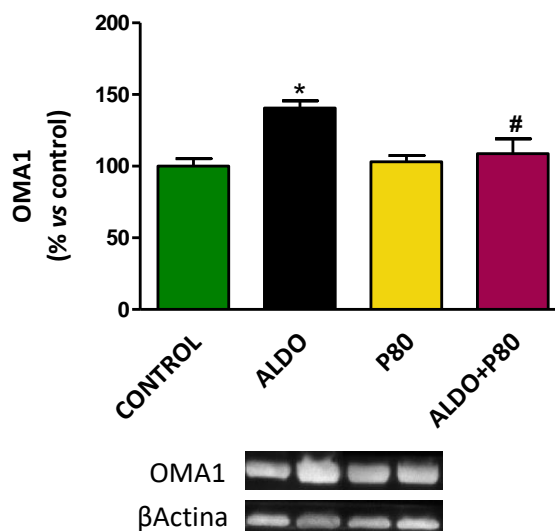


Figura 31. Expresión proteica de OMA1 en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80). * $p < 0,05$ vs CONTROL; # $p < 0,05$ vs ALDO.

6.2.2. *Expresión proteica de la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1).*

Se valoraron los niveles de expresión proteica de las dos isoformas de OPA1: L-OPA1 y S-OPA1. Como se observa en la Figura 32, el grupo ALDO presentó un descenso ($p < 0,05$) de la expresión proteica de la isoforma L-OPA1 y un aumento ($p < 0,05$) de la expresión proteica de la isoforma S-OPA1 con respecto a los animales CONTROL. La expresión de la isoforma L-OPA1 se vio aumentada ($p < 0,05$) y la expresión de la isoforma S-OPA1 se vio disminuida ($p < 0,05$) en el grupo ALDO+P80 con respecto al grupo ALDO, hasta observarse valores similares a los del grupo CONTROL. No se observaron diferencias en la expresión proteica de ninguna de las dos isoformas de OPA1 entre los grupos CONTROL y P80 (Figura 32).

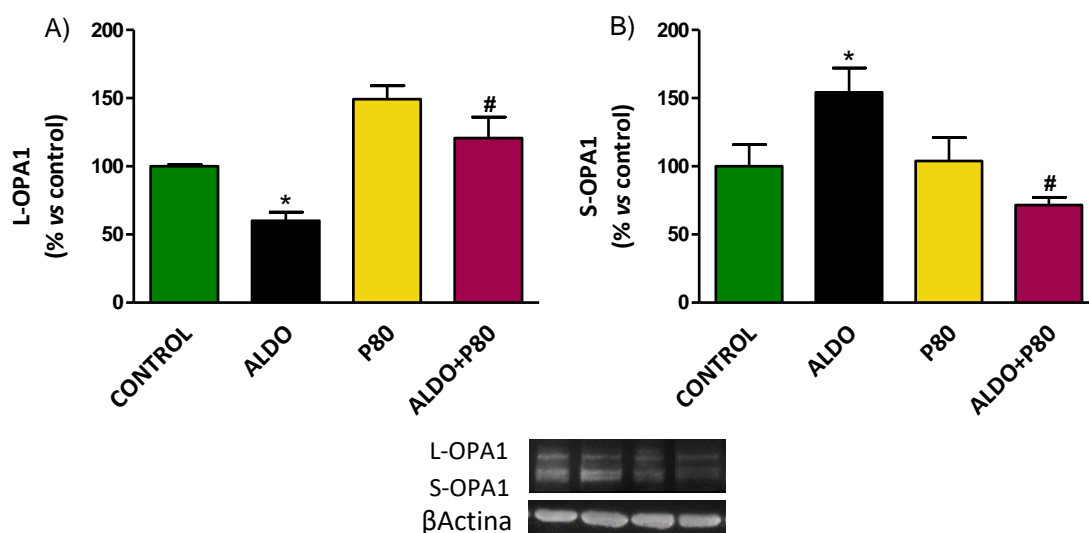


Figura 32. Expresión proteica de: A) L-OPA1 y B) S-OPA1 en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80).
* $p < 0,05$ vs CONTROL; # $p < 0,05$ vs ALDO.

6.2.3. *Expresión proteica de la proteína relacionada con la dinamina 1 (DRP1).*

Los animales del grupo ALDO presentaron unos niveles de DRP1 en aorta aumentados ($p < 0,05$) en comparación con los animales del grupo CONTROL. La expresión proteica de DRP1 disminuyó ($p < 0,05$) en las ratas ALDO+P80 con respecto a los animales ALDO, hasta observarse valores similares a los del grupo CONTROL. No se observaron diferencias significativas en la expresión proteica de DRP1 entre los grupos CONTROL y P80 (Figura 33).

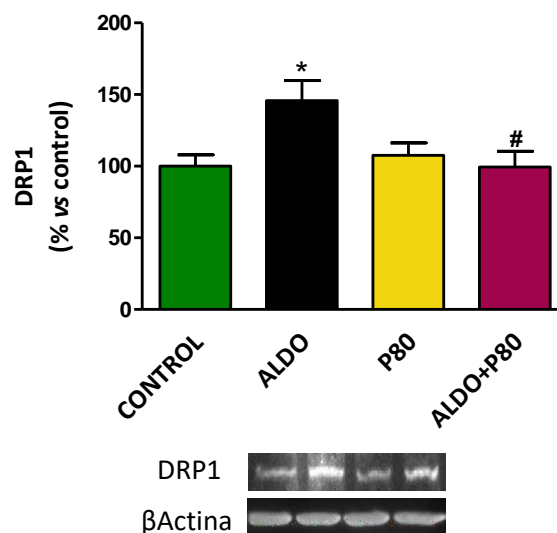


Figura 33. Expresión proteica de DRP1 en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80). * $p < 0,05$ vs CONTROL; # $p < 0,05$ vs ALDO.

6.2.4. Expresión proteica de la mitofusina 1 (MFN1).

Los animales del grupo ALDO presentaron una disminución ($p < 0,05$) de la expresión proteica vascular de MFN1 en comparación con los animales CONTROL. Los niveles de MFN1 aumentaron ($p < 0,05$) en el grupo ALDO+P80 con respecto al grupo ALDO. No se observaron diferencias significativas en la expresión de MFN1 entre los grupos CONTROL y P80 (Figura 34).

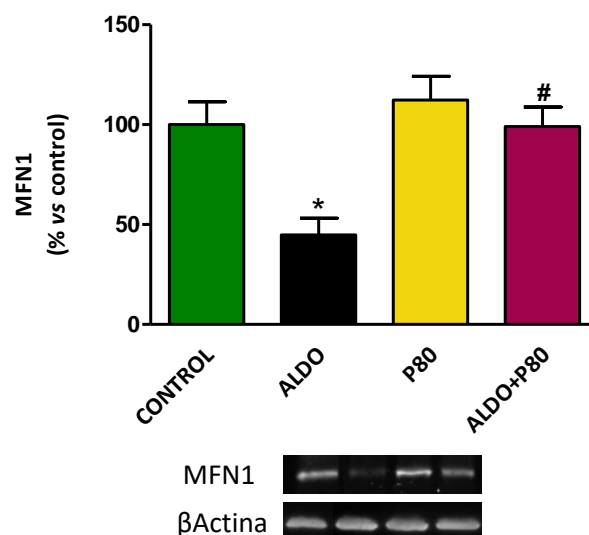


Figura 34. Expresión proteica de MFN1 en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80). * $p < 0,05$ vs CONTROL; # $p < 0,05$ vs ALDO.

6.3. Mitofagia.

6.3.1. *Expresión proteica de la quinasa inducida por PTEN 1 (PINK1).*

Se apreció un descenso ($p < 0,05$) de los niveles de expresión proteica de PINK1 en la aorta de los animales ALDO con respecto a los animales CONTROL. El resto de grupos estudiados no presentaron diferencias significativas entre sí (Figura 35).

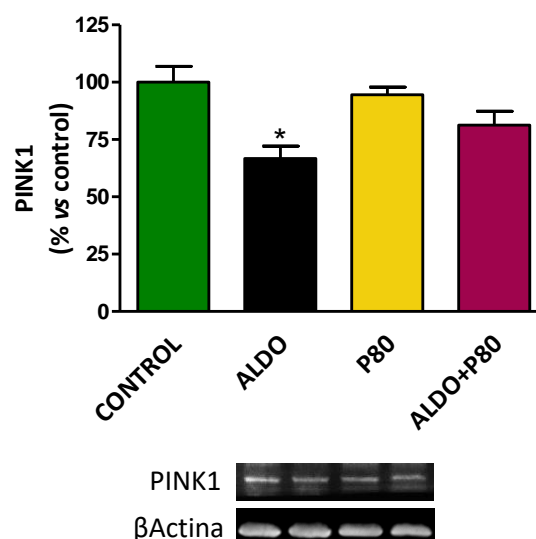


Figura 35. Expresión proteica de PINK1 en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80). * p<0,05 vs CONTROL; # p<0,05 vs ALDO.

6.4. Estado oxidativo mitocondrial.

6.4.1. Expresión proteica de la superóxido dismutasa 2 (SOD2).

La expresión proteica vascular de SOD2 disminuyó (p<0,05) en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL. Los animales ALDO+P80 presentaron unos niveles aumentados (p<0,05) de SOD2 en comparación con el grupo ALDO. No se observaron diferencias significativas en la expresión de SOD2 entre los grupos CONTROL y P80 (Figura 36).

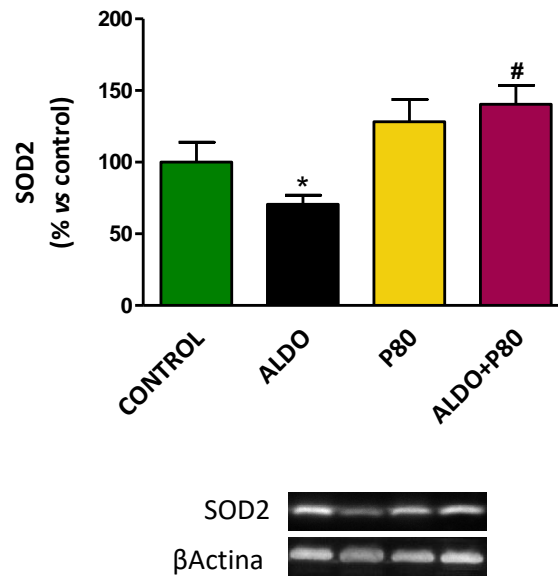


Figura 36. Expresión proteica de SOD2 en los grupos control (CONTROL), aldosterona (ALDO), proantocianidinas (P80) y aldosterona más proantocianidinas (ALDO+P80). * $p < 0,05$ vs CONTROL; # $p < 0,05$ vs ALDO.



Discusión

1. Efectos del tratamiento con proantocianidinas sobre las alteraciones vasculares producidas por la aldosterona en ratas.

1.1.El tratamiento con proantocianidinas previene el desarrollo de hipertensión y mejora las alteraciones de la función vascular producidas por la aldosterona.

En el presente trabajo se observó que la administración de aldosterona produjo un aumento significativo de la PAS en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL. El SRAA es uno de los mecanismos hormonales más importantes en el control de la estabilidad hemodinámica, controlando la presión arterial, el volumen de líquidos y el balance sodio-potasio. Por esta razón, una alteración de los niveles de uno de los componentes del SRAA, como la aldosterona, contribuye en gran medida al desarrollo de hipertensión arterial (122, 124, 350). La aldosterona modula la reabsorción de sodio y agua, modificando el volumen plasmático circulante y regulando así la presión arterial (351). Así mismo, se ha demostrado ampliamente que la aldosterona ejerce efectos sobre la pared arterial dependientes del aumento de la presión arterial producido por la regulación del balance de sodio y agua (83, 84, 352). Estudios previos en modelos animales de hipertensión han demostrado que la administración de aldosterona favorece el remodelado vascular, incrementando la rigidez de los vasos e induciendo el desarrollo de disfunción endotelial, procesos que favorecen el aumento de la presión arterial (77, 84, 353, 354).

Así mismo, los presentes resultados mostraron un deterioro de la función vascular como consecuencia del exceso de aldosterona, tal y como indican la disminución de la respuesta vasodilatadora a ACh y el aumento de la respuesta vasoconstrictora a AII en el grupo ALDO en comparación con el grupo CONTROL. Se ha demostrado ampliamente el papel de la aldosterona en las alteraciones del tono vasomotor y de la función vascular tanto a través de estudios *in vivo* con modelos experimentales de hipertensión como a través de ensayos clínicos con pacientes con hiperaldosteronismo primario. Así, se han observado alteraciones de la función endotelial de pacientes hipertensos (146, 355) o con hiperaldosteronismo primario (356). También se ha observado la reducción de la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio en grandes y pequeñas arterias de ratas control e hipertensas a las que se les había administrado aldosterona (357, 358). Estudios previos en sujetos control y en pacientes con altos niveles de aldosterona en plasma han demostrado que la aldosterona contribuye al proceso de disfunción endotelial por medio de la alteración de la respuesta vasodilatadora frente a agonistas del NO (146, 355, 356). Así mismo, la aldosterona ejerce acciones vasoconstrictoras directas (359, 360), siendo esta respuesta dosis dependiente. Esto último se observó en un estudio realizado en sujetos control en los que se valoró un aumento gradual de la resistencia vascular sistémica en respuesta a la administración de dosis crecientes de aldosterona (361). La aldosterona potencia el efecto vasoconstrictor de la AII por medio de la regulación positiva de sus receptores AT1 (362, 363), aumentando así las alteraciones de la reactividad vascular inducidas por la AII. Dichas alteraciones de la reactividad vascular han sido observadas en estudios realizados en arteria mesentérica de ratones y en microarterias coronarias humanas procedentes de donantes de órganos tras ser incubadas con aldosterona (364, 365).

Es bien sabido que la aldosterona también es capaz de producir cambios en las propiedades mecánicas de la pared vascular a través de las alteraciones de la estructura vascular (78), favoreciendo así el desarrollo de hipertensión arterial y disfunción endotelial. Así mismo, se ha demostrado ampliamente que la disfunción endotelial como respuesta a un exceso de aldosterona se ve exacerbada a su vez por el incremento del estrés oxidativo, del proceso inflamatorio y por la disminución de la biodisponibilidad de NO (77, 143, 197).

Por otra parte, nuestro estudio mostró que el tratamiento con proantocianidinas resultaba en una disminución de la PAS y en una mejora de la función vascular. El grupo ALDO+P80 presentó una mejora de la respuesta vasodilatadora a ACh, así como una disminución en la respuesta vasoconstrictora a AI, AII y FE con respecto al grupo ALDO. El efecto antihipertensivo de las proantocianidinas ha sido demostrado en numerosos estudios. Un estudio realizado en pacientes hipertensos demostró que la administración de proantocianidinas resultaba beneficiosa, induciendo la disminución de la PAS en dichos pacientes (366). A su vez, los efectos beneficiosos de las proantocianidinas sobre la regulación de la presión arterial también han sido demostrados en estudios realizados en modelos animales de hipertensión (367-369). Las proantocianidinas son capaces de proteger e incluso retrasar el desarrollo de la hipertensión arterial. Esto se debe principalmente a la mejora de la función endotelial como consecuencia de una menor producción de EROs; al aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes y a la supresión de factores vasoconstrictores y pro-fibróticos (367, 370, 371).

Así mismo, estudios previos han mostrado los efectos de las proantocianidinas sobre la disfunción vascular. En un ensayo clínico en pacientes con enfermedad

coronaria se observó que un compuesto rico en proantocianidinas era capaz de mejorar la función vascular de dichos pacientes por medio de la disminución del estrés oxidativo (372). Otro estudio en sujetos control y en modelos animales de hipertensión demostró que las propiedades antihipertensivas de las proantocianidinas se relacionaban con la mejora de la función endotelial a través del aumento de la vasodilatación dependiente de NO y de la disminución del estrés oxidativo (342, 367, 373). Los presentes resultados siguen la misma línea que los obtenidos en otros trabajos de investigación, sugiriendo que el tratamiento con proantocianidinas podría estar mejorando las alteraciones sobre la PAS y la función vascular producidas por la administración de aldosterona en ratas.

1.2.El tratamiento con proantocianidinas mejora las alteraciones sobre el remodelado de la pared vascular y la fibrosis producidas por la aldosterona.

En el presente estudio se observó el desarrollo de remodelado vascular, reflejado en el aumento del contenido de colágeno y en el aumento de grosor de la lámina media de la aorta de los animales del grupo ALDO con respecto a los del grupo CONTROL.

El aumento del contenido de colágeno de la pared de la aorta de los animales a los que se les administró aldosterona, estuvo acompañado por la sobreexpresión de CTGF en comparación con los animales del grupo CONTROL. Diversos estudios en modelos experimentales de hipertensión han demostrado que la aldosterona participa en la regulación de CTGF en la pared vascular (179, 183). El CTGF activa a los fibroblastos, estimulando así la síntesis de los componentes de la MEC conduciendo al remodelado y

a la fibrosis de la pared vascular (178). El remodelado de la pared arterial participa en el desarrollo de hipertensión local, que a su vez estimula la expresión de CTGF (183, 374, 375). De este modo, se establece un sistema de retroalimentación positiva por el que la hipertensión favorece la expresión de CTGF, y éste, a través de los procesos de fibrosis y remodelado vascular, favorece el desarrollo de hipertensión (376). Así mismo, la aldosterona es capaz de estimular la expresión y la actividad de determinados factores que participan en el inicio del remodelado tanto en el corazón como en las arterias (13). Un ejemplo de ello es el aumento de expresión de la proteína p53 en las CMLV; lo que da lugar al aumento de la capacidad proliferativa de las mismas (377); o la regulación positiva de los receptores vasculares de Ang II, críticos en la respuesta vasoconstrictora (363). La aldosterona ejerce un efecto directo sobre diversas vías de señalización en las CMLV, activando la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), la MAPK y la tirosina quinasa c-Src entre otras (378, 379). Así, la aldosterona constituye un factor de estrés para las CMLV, aumentando el crecimiento y la proliferación de las mismas, así como la formación de fibras de colágeno (80, 380). El remodelado vascular que se observa en las ratas a las que se les administró aldosterona podría estar actuando como un primer mecanismo de defensa del vaso frente a la elevada presión arterial cuya progresión en el tiempo dará lugar a la aparición de fibrosis vascular.

El tratamiento con proantocianidinas moduló el remodelado vascular, observándose una disminución del área de la lámina media, del contenido de colágeno y de la expresión proteica de CTGF en la aorta de los animales pertenecientes al grupo ALDO+P80 en comparación con los del grupo ALDO. Estudios previos en modelos experimentales de hipertensión han mostrado la capacidad de las proantocianidinas para reducir el remodelado de la pared arterial a través de la regulación de marcadores

de fibrosis, como TGF β 1, y de la prevención del engrosamiento de la lámina media y del acúmulo de fibras de colágeno en la MEC (373, 381, 382). A su vez, se ha observado que las proantocianidinas también previenen el remodelado vascular a través de la regulación de la función endotelial (373) y de la disminución del estrés oxidativo (381). Por otro lado, trabajos previos de nuestro grupo de investigación en un modelo de hiperaldosteronismo en ratas han puesto de manifiesto que el tratamiento con proantocianidinas es capaz de reducir la expresión del marcador de fibrosis CTGF así como el contenido de colágeno en el corazón (44, 345). En el presente estudio se ha observado por primera vez, que el tratamiento con proantocianidinas es capaz de disminuir los valores de expresión proteica de CTGF y el contenido de colágeno en la aorta de las ratas tras la administración de aldosterona, favoreciendo así la regulación del remodelado vascular.

1.3.El tratamiento con proantocianidinas mejora la inflamación y la oxidación vascular, estimuladas por la aldosterona.

Inflamación.

Junto con el desarrollo de hipertensión y fibrosis, se observó un aumento de los valores de expresión aórtica del mediador pro-inflamatorio TNF α en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL. La aldosterona desempeña un papel fundamental en el desarrollo y el mantenimiento de los procesos de inflamación y remodelado vascular (85, 86, 88). A su vez, la respuesta inflamatoria favorece el desarrollo de la disfunción

endotelial y por tanto, el progreso de la enfermedad vascular (163). Un endotelio disfuncional proporciona un entorno pro-inflamatorio y promueve el reclutamiento y la adhesión de células inflamatorias; monocitos, macrófagos y linfocitos (383-385). Esto último se observó en un modelo experimental en el que la administración de aldosterona resultó en alteraciones de la función y de la estructura vascular en la aorta de ratones, así como en una mayor infiltración de células como macrófagos y linfocitos en la pared vascular (358). La administración de aldosterona se asocia con una respuesta inflamatoria en la pared arterial, lo cual se refleja en un aumento de marcadores de inflamación tales como: la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (77), IL-1, IL-6 y TNF α (160, 161). Uno de los mediadores de los efectos pro-inflamatorios de la aldosterona es el NF- κ B, responsable de iniciar la transcripción de genes pro-inflamatorios que codifican moléculas de adhesión como ICAM-1 y la proteína quimio-atrayente de monocitos tipo 1, y citoquinas pro-inflamatorias como IL6 y TNF α (163, 164, 386).

Por otro lado, el tratamiento con proantocianidinas produjo una disminución de la expresión proteica del marcador de inflamación TNF α en la aorta de los animales del grupo ALDO+P80 en comparación con los animales del grupo ALDO. Diversos estudios epidemiológicos sugieren que la capacidad protectora de las proantocianidinas frente a la enfermedad cardiovascular se debe principalmente a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (327, 336, 337). Estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos experimentales han revelado que las proantocianidinas son capaces de modular directamente la expresión de factores clave implicados en los mecanismos de inflamación, así como las vías de señalización de los factores NF- κ B y la MAPK (327, 332, 343, 387). Ensayos previos *in vitro* en CE aisladas de cordón umbilical humano

estimuladas con TNF α mostraron que la incubación con proantocianidinas disminuía la expresión de moléculas de adhesión tales como ICAM-1 y VCAM-1 (339, 388). Otro estudio en un modelo experimental de trombosis vascular profunda demostró que la administración de proantocianidinas resultaba en la disminución de la expresión vascular de citoquinas pro-inflamatorias como la IL8, la IL6 y el TNF α , participando así en la protección del endotelio (389). Nuestros resultados van en línea con los datos recogidos en la literatura, sugiriendo que las proantocianidinas presentan propiedades antiinflamatorias a nivel vascular, ya que podrían actuar inhibiendo la formación de mediadores pro-inflamatorios tales como TNF α .

Oxidación.

El proceso inflamatorio que se da en respuesta a un exceso de aldosterona es parcialmente dependiente del desarrollo de estrés oxidativo (164). Así, el aumento del estrés oxidativo y la inflamación son los primeros efectos del exceso de aldosterona a nivel vascular (77). En nuestro estudio, el desarrollo de inflamación vascular se vio acompañado por un incremento de la expresión proteica de la subunidad p22phox de la NADPHox en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL. La NADPHox juega un papel importante en el daño vascular inducido por la aldosterona, ya que a través del RM estimula la generación de EROs en las CE (390). A su vez, la NADPHox reduce la capacidad de eliminación de dichas EROs por parte de las células, favoreciendo así el desarrollo de estrés oxidativo (83, 85). En un ensayo *in vitro* con células mesangiales de rata estimuladas con aldosterona se observó un incremento de la actividad de la NADPHox a

través del RM (391). A su vez, un estudio en un modelo experimental de ratas hipertensas demostró que la administración de aldosterona resultaba en el aumento de la expresión renal de la subunidad p22phox de la NADPHox (392). En esta misma línea de investigación, también se ha observado el aumento de la actividad de la NADPHox y de la subunidad p22phox a nivel vascular y cardíaco en ratas a las que se les había administrado aldosterona, aumentando de esta forma el estrés oxidativo así como los procesos de inflamación y fibrosis (393, 394).

Así mismo, la expresión proteica de la eNOS y la de su forma fosforilada en el residuo de serina 1177 p-eNOS^{Ser1177} disminuyó en la aorta de los animales del grupo ALDO con respecto a los animales del grupo CONTROL. El NO producido por la eNOS es esencial para el correcto funcionamiento del endotelio y constituye el principal mediador de la función endotelial normal, desencadenando la disminución de la biodisponibilidad de NO característica del proceso de disfunción endotelial (395, 396). Un estudio previo en un modelo experimental de hipertensión relacionó el uso del antagonista del RM, eplerenona, con el aumento de la expresión vascular de la eNOS y la mejora de la función vascular, sugiriendo que la aldosterona participaba en las alteraciones vasculares funcionales de dicho modelo de hipertensión (152). Por otro lado, un ensayo en un modelo animal de insuficiencia cardíaca demostró que la administración de otro antagonista del RM, en este caso espironolactona, resultaba en el aumento de la expresión cardíaca y vascular de la eNOS. De este modo la administración de espironolactona previno la disminución de la biodisponibilidad de NO y la disfunción vascular en dicho modelo de insuficiencia cardíaca (397). Se ha demostrado en ensayos *in vitro* con CE procedentes de cordón umbilical humano que la incubación con aldosterona produce la disminución de la expresión de la forma

fosforilada de la eNOS, p-eNOS^{Ser1177}, y por tanto la biodisponibilidad de NO. Así, los niveles excesivos de aldosterona estarían alterando la correcta función de la CE (398, 399). Dichos estudios, junto con numerosos datos recogidos en la literatura, ponen de manifiesto que los niveles elevados de aldosterona desempeñan un papel importante en la inhibición de la eNOS en situaciones patológicas (78, 143). Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la aldosterona estaría incrementado el estrés oxidativo y disminuyendo la biodisponibilidad de NO a nivel vascular. De este modo, el desequilibrio entre la biodisponibilidad de NO y el estrés oxidativo facilitarían el desarrollo de inflamación y de remodelado vascular, participando así en las alteraciones de la función vascular observadas en el grupo ALDO.

El tratamiento con proantocianidinas disminuyó los valores aumentados de expresión proteica de la subunidad p22phox de la NADPHox en la aorta de los animales del grupo ALDO+P80 en comparación con los animales del grupo ALDO. La capacidad antioxidante de las proantocianidinas se debe a la presencia de grupos fenólicos en su estructura capaces de actuar capturando los electrones desapareados de las EROs, generando de esta forma especies menos reactivas (313, 327). De esta forma, las proantocianidinas son capaces de prevenir la oxidación, asociándose su administración con una disminución de los marcadores de estrés oxidativo tanto en modelos experimentales como en sujetos control (328, 343, 400, 401). Las proantocianidinas contribuyen a la defensa frente al estrés oxidativo a través de la regulación de sistemas de detoxificación celular como la catalasa y la SOD (327), y por medio de la inhibición de enzimas generadoras de EROs como el sistema NADPHox (308, 402). Un estudio previo de nuestro grupo de investigación mostró que el tratamiento con proantocianidinas producía la disminución de la expresión de la subunidad p22phox en el corazón de ratas

con hiperaldosteronismo. En dicho estudio, los efectos de las proantocianidinas fueron análogos a los obtenidos en los animales con hiperaldosteronismo tratados con espironolactona, sugiriendo que las proantocianidinas podrían actuar bloqueando el RM (345).

Por último, el tratamiento con proantocianidinas fue capaz de aumentar la expresión proteica de la eNOS y su forma fosforilada p-eNOS^{Ser1177} en la aorta de los animales del grupo ALDO+P80 en comparación con el grupo ALDO. Las proantocianidinas modulan la expresión y la actividad de la eNOS, incrementando así la biodisponibilidad de NO. Esto último ha sido demostrado en diferentes estudios *in vitro* en CE procedentes de arteria coronaria humana y de cordón umbilical humano tratadas con diferentes compuestos ricos en proantocianidinas (403-405). Así mismo, se observó en ensayos en anillos de aorta de rata con endotelio y pre-contraídos con PE que la incubación con proantocianidinas inducía un efecto vasodilatador dosis dependiente. Los resultados de dicho estudio mostraron a su vez que el efecto vasodilatador de las proantocianidinas era dependiente de endotelio y que podría ser debido a la activación de la eNOS (406). El mecanismo a través del cual las proantocianidinas regulan la actividad de la eNOS es aún tema de estudio, sin embargo, se ha propuesto que la activación de la eNOS podría estar asociada a la homeostasis del calcio. Un aumento del calcio intracelular actuaría activando a la CAMK2, la cual induciría la activación de la eNOS y por tanto promovería el aumento de la biodisponibilidad de NO (343). Las proantocianidinas también podrían regular la actividad de la eNOS a través de la activación de la vía de señalización Src/fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)/proteína quinasa B (Akt), la cual conduce a la activación de la eNOS a través de su fosforilación en el residuo de serina 1177 (343, 407, 408). Es bien sabido, que la homeostasis vascular se

consigue gracias a una producción y una biodisponibilidad adecuada de NO, el cual desempeña un papel fundamental en la regulación del tono vascular (313). En esta línea, estudios a nivel vascular en anillos de aorta torácica, arteria mesentérica y en arteria coronaria de rata incubadas con compuestos ricos en proantocianidinas han puesto de manifiesto que las proantocianidinas podrían mejorar la función vascular induciendo la relajación endotelio dependiente por medio de la mayor producción y por tanto mayor biodisponibilidad de NO, así como por un aumento de la expresión de p-eNOS^{Ser1177} (409-411). El incremento de expresión de la eNOS y de su forma fosforilada p-eNOS^{Ser1177} sugiere que el tratamiento con proantocianidinas estaría aumentando la biodisponibilidad de NO a nivel vascular tras la administración de aldosterona, lo que podría contribuir a la mejora de la función vascular observada en el presente trabajo. A su vez, el tratamiento con proantocianidinas estaría reduciendo la respuesta inflamatoria y oxidativa vascular, previniendo de esta forma el deterioro de la función vascular así como el desarrollo de hipertensión y remodelado arterial, procesos inducidos tras la administración de aldosterona en ratas.

2. Efectos del tratamiento con proantocianidinas sobre las alteraciones en la expresión proteica vascular de SGK1, ENaC y Nedd4-2 producidas por la aldosterona en ratas.

2.1 La administración de aldosterona aumenta la expresión vascular de los mediadores implicados en el transporte de sodio.

SGK1

En el presente trabajo se observó un aumento de la expresión proteica vascular de SGK1 en los animales pertenecientes al grupo ALDO en comparación con el grupo CONTROL. Es bien conocido que la aldosterona estimula la expresión de SGK1 de forma fisiológica (33, 35, 37, 38). En un estudio en ratas a las que se les extrajeron las glándulas suprarrenales y se les administraron dosis fisiológicas de aldosterona se demostró que la aldosterona inducía la expresión de SGK1 a nivel renal e intestinal (40). Recientemente, se observó que la expresión de SGK1 estaba aumentada en el corazón de ratas a las que se les había administrado aldosterona (44, 393). En el presente trabajo se ha descrito por primera vez que la administración de aldosterona también produce el aumento de la expresión de SGK1 a nivel vascular.

Junto con el aumento de expresión proteica aórtica de SGK1 observamos un aumento de la expresión del mediador de fibrosis CTGF y del mediador pro-inflamatorio TNF α en la aorta de los animales del grupo ALDO en comparación con los animales CONTROL. EL SGK1 parece estar directamente relacionado con el desarrollo de inflamación y fibrosis en situaciones de hiperaldosteronismo (25, 412). Estudios previos mostraron que en modelos experimentales *knockout* para SGK1 expuestos a niveles aumentados de aldosterona más sal, no se producía el desarrollo de la fibrosis renal y cardiaca producida normalmente por el exceso de aldosterona (413, 414). En esta misma línea, diversos estudios han puesto de manifiesto que SGK1 es capaz de estimular la actividad del factor nuclear NF- κ B (415, 416). SGK1, a través de la activación de NF- κ B estimula la producción de factores de transcripción como CTGF, y de diversas citoquinas como IL-1 β y TNF α (25, 414, 417).

Así mismo, en nuestro estudio observamos un aumento de la expresión proteica de la subunidad p22phox de la NADPHox así como una disminución de la expresión proteica tanto de la eNOS como de la p-eNOS^{Ser1177} a nivel vascular en el grupo ALDO frente al grupo CONTROL. Un estudio previo en un modelo *in vitro* de células de músculo liso de arteria pulmonar estimuladas con trombina y con H₂O₂ demostró que diversos factores como las EROs y el NO estimulaban la actividad de SGK1 (418). Tomado en conjunto, los resultados mostrados podrían sugerir que el aumento de expresión proteica de SGK1 observado en respuesta a un exceso de aldosterona más sal podría ser debido, entre otras causas, al aumento del estrés oxidativo y a la disminución de la biodisponibilidad de NO que sugieren nuestros resultados. A su vez, el aumento de la expresión vascular de SGK1 producida por la administración de aldosterona podría estar

favoreciendo el desarrollo de alteraciones moleculares a nivel vascular tales como la fibrosis, la inflamación y el estrés oxidativo observadas en el presente trabajo.

ENaC

Junto con el aumento de la expresión proteica de SGK1, la administración de aldosterona también modificó los niveles de expresión de las tres subunidades (α , β y γ) de ENaC. Se observó un aumento de la expresión aórtica de las tres subunidades de ENaC en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL. Estudios *in vitro* en una línea celular de la nefrona distal y en modelos experimentales a nivel renal han demostrado que niveles elevados de aldosterona inducen la expresión del canal, aumentando la expresión de una u otra de sus subunidades y estimulando así la entrada de sodio a las células (46, 62). A nivel renal, la aldosterona produce el aumento de la expresión α ENaC, mientras que a nivel intestinal promueve la expresión de β y γ ENaC (47). Estudios recientes de nuestro grupo de investigación en un modelo experimental de hiperaldosteronismo mostraron que la aldosterona producía el aumento de la subunidad γ ENaC a nivel cardíaco (44). En el presente trabajo se ha descrito por primera vez que la administración de aldosterona estimula la expresión vascular de las tres subunidades (α , β y γ) de ENaC. Es bien conocido, que el transporte inadecuado de sodio a través de ENaC puede dar lugar a algunas formas de hipertensión (419). La aldosterona actúa mediante su unión al RM, el cual una vez activado, induce la transcripción de ENaC, aumentando así su expresión celular (43). A su vez, la aldosterona produce el aumento de la expresión y la actividad de ENaC a través de SGK1. Estudios previos en oocitos de

Xenopus laevis han descrito que SGK1 es capaz de modular la actividad de ENaC mediante la fosforilación directa del canal (63, 64). ENaC desempeña un papel importante en la absorción de sodio, y por tanto en la regulación del balance del sodio de los fluidos extracelulares y de la presión arterial (42, 420). Es por esto que una sobreexpresión de este canal conduciría a una entrada excesiva de sodio a la célula. Teniendo en cuenta lo anterior, el aumento de expresión proteica de las tres subunidades de ENaC (α , β y γ) observado a nivel vascular en respuesta a unos niveles exacerbados de aldosterona podría estar sugiriendo un aumento de la reabsorción de sodio vascular. El aumento de la reabsorción de sodio a nivel vascular podría participar en el desarrollo de algunas de las alteraciones observadas en el presente trabajo, tales como la hipertensión arterial.

Estudios previos han demostrado que ENaC determina las propiedades mecánicas de las CE y la liberación de NO, así como el tono vascular. ENaC ejerce una influencia fundamental sobre la regulación de la presión arterial y sobre la patogénesis de la hipertensión arterial (420, 421). Se ha observado en estudios *in vitro* en CE estimuladas con aldosterona que el exceso de la misma estimula la expresión y la inserción del canal en la membrana plasmática (422) así como un aumento de la rigidez cortical de las CE (421). Por otro lado, un estudio en arteria mesentérica de rata precontracta con PE e incubada con el bloqueador de ENaC, amilorida, demostró de manera indirecta la asociación entre ENaC y una mayor respuesta vasoconstrictora por medio de la regulación negativa de la producción de NO (423). En el presente trabajo, el aumento de expresión de las tres subunidades (α , β y γ) de ENaC en respuesta a niveles elevados de aldosterona estuvo acompañado de alteraciones en la función vascular, así como de una reducción de la expresión proteica de eNOS y de su forma fosforilada p-

eNOS^{Ser1177}. Tomado en conjunto, el aumento de la expresión de ENaC en la membrana plasmática en respuesta a niveles elevados de aldosterona podría estar aumentando la rigidez endotelial, alterando de esta forma la liberación de NO y por tanto la función vascular. Así, nuestro estudio aporta datos novedosos sobre como la aldosterona podría estar aumentando la entrada de sodio a nivel vascular y modificando así la función vascular.

Nedd4-2

La sobreexpresión de SGK1 y de las tres subunidades, α , β y γ , de ENaC estuvo acompañada por un aumento de la expresión de Nedd4-2. En el presente trabajo describimos por primera vez la expresión de Nedd4-2 en aorta de ratas. La función principal de Nedd4-2 es inhibir el paso de sodio a través de ENaC. Para ello, se encarga de ubiquitinar a ENaC, favoreciendo de esta forma la internalización del canal y su posterior degradación, reduciendo así su expresión y por tanto su función (424-427). La regulación que ejerce Nedd4-2 sobre ENaC no es constitutiva, sino que es debida principalmente a las acciones de la aldosterona. La aldosterona promueve la expresión de SGK1, siendo este último capaz de fosforilar y por tanto inactivar a Nedd4-2 (55). La disminución de la expresión de Nedd4-2 estuvo acompañada por un aumento de expresión de su forma fosforilada, pNedd4-2, en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL. SGK1 es capaz de fosforilar a Nedd4-2, reduciendo la capacidad del mismo para ubiquitinar a ENaC, resultando dicha fosforilación en el aumento de la inserción del canal en la membrana plasmática (37, 43). Los presentes resultados sugieren por tanto

que la aldosterona, por medio de su unión al RM, estaría induciendo la expresión de SGK1, el cual a su vez estaría promoviendo la fosforilación y por tanto la inhibición de Nedd4-2. La inactivación de Nedd4-2 impediría de esta forma la unión entre este último y ENaC, previniendo la ubiquitinación y posterior degradación de ENaC. Esta interacción resultaría en el aumento del número de canales de ENaC en la pared vascular y en el incremento por tanto de la entrada de sodio a la célula.

En conjunto, la administración de aldosterona ha resultado en la sobreexpresión de SGK1, de las tres subunidades de ENaC y de la forma fosforilada de Nedd4-2, así como en la disminución de la expresión de Nedd4-2 a nivel vascular en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL. Estos resultados sugieren que los niveles elevados de aldosterona podrían estar estimulando la entrada de sodio a nivel vascular a través del transportador ENaC. El posible aumento de la entrada de sodio en las células de la pared vascular, podría estar contribuyendo al desarrollo de alteraciones vasculares como la hipertensión, la disfunción endotelial y la fibrosis observadas en el presente estudio.

2.2. El tratamiento con proantocianidinas disminuye la expresión de los mediadores implicados en el transporte de sodio vascular.

SGK1

En el presente trabajo observamos que las alteraciones en los mediadores implicados en la entrada de sodio a nivel vascular producidas por la administración de aldosterona fueron bloqueadas con el tratamiento con proantocianidinas. Este efecto se observó previamente en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación. En dicho estudio se demostró que la administración de proantocianidinas disminuía la expresión del RM en células CV-1, una línea celular de riñón, estimuladas con aldosterona. A su vez, se observó a nivel cardiaco en un modelo de hiperaldosteronismo que el efecto beneficioso de las proantocianidinas era análogo al de la espironolactona, permitiendo sugerir el posible papel de las proantocianidinas como antagonistas del RM (345). Estos antecedentes, junto con los resultados obtenidos en el presente estudio, contribuyen de manera significativa a la hipótesis de la actuación de las proantocianidinas como posibles antagonistas del RM.

El tratamiento con proantociandidinas resultó en la disminución de la expresión proteica vascular de SGK1, tal y como se observa en el grupo ALDO+P80 en comparación con el grupo ALDO. La disminución de su expresión a nivel vascular en respuesta al tratamiento con proantocianidinas podría estar relacionada con la disminución de la expresión de otros marcadores como TNF α y CTGF observada también a nivel vascular

en el presente trabajo en respuesta al tratamiento con proantocianidinas. Ha sido descrito que SGK1 es capaz de estimular la actividad de NF- κ B, el cual a su vez, estimula la transcripción de CTGF y la producción de citoquinas como TNF α (414, 428, 429). Así, la disminución de la expresión vascular de SGK1 en respuesta al tratamiento con proantocianidinas podría estar relacionada con la mejora de alteraciones observadas tales como la fibrosis y la inflamación a nivel vascular.

ENaC y Nedd4-2

El tratamiento con proantocianidinas produjo una disminución de la expresión de las tres subunidades (α , β y γ) de ENaC a nivel vascular en el grupo ALDO+P80 con respecto al grupo ALDO. Dicha disminución de la expresión estuvo acompañada por el aumento de la expresión de Nedd4-2 y por la disminución de pNedd4-2 a nivel vascular en el grupo ALDO+P80 en comparación con el grupo ALDO. El posible bloqueo del RM y la disminución de la expresión de SGK1 tras el tratamiento con P80 podrían explicar la disminución de la expresión de ENaC en el grupo ALDO+P80 con respecto al grupo ALDO. Por otro lado, como se ha descrito previamente, SGK1 inactiva a Nedd4-2 mediante su fosforilación (68, 430). Por ello, la disminución de la expresión de SGK1 podría explicar la disminución de la expresión de pNedd4-2 y el aumento de Nedd4-2. Estos resultados muestran por primera vez la capacidad de las proantocianidinas para disminuir la sobreexpresión de las tres subunidades (α , β y γ) de ENaC y para modular la expresión de Nedd4-2 y su forma fosforilada a nivel vascular. Un estudio previo de nuestro grupo de investigación demostró que el tratamiento con proantocianidinas en un modelo

animal de hiperaldosteronismo resultaba en la disminución de la expresión proteica cardiaca de SGK1 y de la subunidad γ ENaC, así como en la modulación de la expresión de Nedd4-2 y pNedd4-2. En consecuencia, la disminución de SGK1 previno la inactivación de Nedd4-2 y la sobreexpresión de γ ENaC a nivel cardiaco (44). En el presente trabajo, el bloqueo de la sobreexpresión de SGK1 debido al tratamiento con proantocianidinas estaría previniendo el aumento de expresión de las tres subunidades (α , β y γ) de ENaC, y por tanto el aumento de la actividad y la inserción del canal en la pared vascular. Por otro lado, también estaría previniendo la fosforilación y posterior inactivación de Nedd4-2. Las proantocianidinas por tanto podrían estar modulando la entrada de sodio a las células vasculares. Estos resultados son particularmente interesantes, ya que la entrada excesiva de sodio desempeña un papel importante en el desarrollo de alteraciones vasculares, incluyendo el remodelado vascular (431-433) y la hipertensión (434, 435). En conjunto, estos resultados sugieren que las proantocianidinas podrían estar actuando como antagonistas del RM, regulando así la expresión de diversos mediadores implicados en la captación de sodio a nivel vascular, pudiendo prevenir de esta manera el desarrollo de las alteraciones funcionales, estructurales y moleculares a nivel vascular asociadas a niveles excesivos de aldosterona.

3. Efecto del tratamiento con proantocianidinas sobre las alteraciones mitocondriales vasculares producidas por la aldosterona en ratas.

3.1. La administración de aldosterona altera la expresión de los mediadores implicados en el proceso de biogénesis mitocondrial vascular.

La expresión proteica de SIRT1 disminuyó significativamente en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL. Un estudio previo en células del túbulo colector de ratón estimuladas con aldosterona identificó a SIRT1 como un posible modulador de la vía de señalización de la aldosterona, observándose una relación entre los niveles elevados de aldosterona y la disminución de la expresión génica de SIRT1 (436). Se demostró que la sobreexpresión de SIRT1 en células de túbulo colector principal era capaz de inhibir el aumento de la transcripción de α ENaC así como de su actividad, procesos inducidos por la aldosterona. En dicho estudio se propuso por tanto el papel fundamental que desempeña SIRT1 en la prevención del daño renal inducido por la aldosterona (436). En un modelo experimental de hiperaldosteronismo, se observó que la aldosterona estaba produciendo cambios similares a los producidos por la senescencia celular a nivel renal, así como una reducción de la expresión de SIRT1 (437). El presente trabajo muestra por primera vez que la administración de aldosterona produce la disminución de la expresión proteica de SIRT1 en aorta de ratas. Por tanto,

podríamos proponer que las alteraciones vasculares observadas en el grupo ALDO podrían estar mediadas, al menos en parte, por el descenso en los niveles de SIRT1.

La disminución de la expresión proteica vascular de SIRT1 en respuesta a niveles excesivos de aldosterona se vio acompañada por la reducción de la expresión proteica vascular de PGC1 α en el grupo ALDO en comparación con el grupo CONTROL. SIRT1 es capaz de activar a PGC1 α mediante desacetilación (254, 438). PGC1 α constituye el principal factor regulador del proceso de biogénesis mitocondrial (237, 250), así como de la defensa antioxidante (439). Estudios previos realizados en modelos celulares han demostrado la relación existente entre los niveles excesivos de aldosterona y el desarrollo de disfunción mitocondrial a nivel renal. Se observó en modelos *in vitro* de podocitos (305, 439, 440) y de células del túbulo proximal (441) que la infusión de aldosterona resultaba en la reducción al 50% de las copias de ADNmt, induciendo así el desarrollo de disfunción mitocondrial. Por otro lado, se comprobó que la aldosterona suprimía la activación de la vía SIRT1-PGC1 α , viéndose esto reflejado en una reducción de la expresión de SIRT1, PGC1 α y TFAM, reguladores clave de la biogénesis mitocondrial (305). Estos estudios permitieron sugerir por tanto, que la disfunción mitocondrial podría ser otro de los mecanismos a través de los cuales la aldosterona ejerce daño a nivel renal (305, 439-441). Por otro lado, se observó que la sobreexpresión de PGC1 α en el endotelio podría tener un efecto protector frente a la hipertensión producida en respuesta a una sobre-activación del RAAS (237). Además, el aumento de la biogénesis mitocondrial en respuesta a una sobreexpresión de PGC1 α contribuiría a la síntesis de nuevas mitocondrias no dañadas, lo cual podría constituir un mecanismo de protección de la CE frente al estrés oxidativo (237).

La disminución de la expresión proteica de PGC1 α estuvo acompañada a su vez por una reducción de la expresión vascular de NRF1 y TFAM en el grupo ALDO en comparación con el grupo CONTROL. Una de las principales funciones del PGC1 α es la modulación de la expresión de diversas proteínas implicadas en el proceso de biogénesis mitocondrial a través de su interacción con factores de transcripción como NRF1. NRF1 a su vez estimula la expresión de TFAM, efector final encargado de activar la duplicación de las moléculas de ADNmt (250). Estudios previos tanto en podocitos de cultivo primario estimulados con aldosterona como a nivel renal en ratones con hiperaldosteronismo, han demostrado que niveles excesivos de aldosterona resultan en la disminución de la expresión proteica de TFAM y favorecen a su vez el proceso de disfunción mitocondrial (442). El presente trabajo muestra por primera vez el efecto del exceso de aldosterona sobre el proceso de biogénesis mitocondrial en aorta de ratas. Los niveles exacerbados de aldosterona podrían actuar suprimiendo la vía SIRT1-PGC1 α -NRF1-TFAM, y por tanto reduciendo el proceso de biogénesis mitocondrial.

El proceso de biogénesis mitocondrial está a su vez íntimamente ligado al desarrollo de hipertensión (443, 444). Un estudio previo ha asociado la presencia del polimorfismo Gly483Ser de PGC1 α con el desarrollo de hipertensión en sujetos masculinos blancos de la población austriaca (445). Así mismo, se ha demostrado en un modelo experimental de hipertensión, que la disminución de la masa mitocondrial en el miocardio se ve acompañada por la disminución de la expresión de genes implicados en el proceso de biogénesis mitocondrial como PGC1 α y TFAM (446). Por otro lado, diversos trabajos han puesto de manifiesto la relación entre el desarrollo de hipertensión como consecuencia de la activación del SRAA y las alteraciones de la dinámica mitocondrial a nivel cardiaco. En un modelo experimental de hipertensión y daño cardiaco producidos

por niveles elevados de renina, se observó un aumento de la densidad y la estructura mitocondrial (447). Así mismo, un estudio en animales transgénicos portadores de genes humanos de renina y angiotensinógeno, demostró que junto con el desarrollo de hipertensión e hipertrofia cardíaca se observaba una disminución de la expresión cardíaca de marcadores de biogénesis mitocondrial tales como PGC1 α , TFAM y NRF1 (448). Estas evidencias parecen relacionar la sobre-activación del SRAA con la regulación de la función mitocondrial en el desarrollo de la hipertensión arterial. Los resultados del presente trabajo muestran por primera vez el papel que desempeña el exceso de aldosterona en las alteraciones del proceso de biogénesis mitocondrial a nivel vascular, las cuales podrían estar contribuyendo al desarrollo de hipertensión arterial.

Las alteraciones en los marcadores de biogénesis mitocondrial estuvieron acompañadas por una disminución de la expresión proteica vascular tanto de la eNOS como de su forma fosforilada p-eNOS^{Ser1177} en el grupo ALDO en comparación con el grupo CONTROL. La eNOS desempeña un papel clave en la biogénesis y la función mitocondrial (304, 449, 450). La regulación de la biogénesis mitocondrial mediada por la biodisponibilidad de NO ha sido estudiada en diversos tejidos. En esta línea, un estudio llevado a cabo en ratones deficientes para la eNOS demostró en tejidos cerebral, renal, hepático y cardíaco que la disminución de la biodisponibilidad de NO se relacionaba con la reducción del contenido mitocondrial y por tanto del proceso de biogénesis mitocondrial (451). Así mismo, se observó en otro estudio que el desacoplamiento de la eNOS podía conducir al desarrollo de alteraciones de la función cardíaca así como a la disminución de la expresión de PGC1 α , NRF1, NRF2 y TFAM y a la atenuación de la biogénesis mitocondrial a nivel cardíaco (452). El papel que desempeña la eNOS y la biodisponibilidad de NO en el proceso de biogénesis mitocondrial vascular

no es del todo conocido. Un estudio en ratas tratadas con un inhibidor de la eNOS resultó en una disminución de la biogénesis mitocondrial en aorta, sugiriendo que la eNOS podría desempeñar un papel fundamental en la regulación de la biogénesis mitocondrial a nivel vascular y en la regulación de tasa de renovación mitocondrial (453). Por otro lado, en un estudio en ratones deficientes para la eNOS se demostró que esta deficiencia resultaba en el desarrollo de hipertensión así como en la disminución del contenido mitocondrial (454). El mecanismo a través del cual la deficiencia de la eNOS resulta en una disminución de la biogénesis mitocondrial no es completamente conocido, sin embargo se cree que la regulación que ejerce la eNOS sobre PGC1 α podría desempeñar un papel importante (455). El presente trabajo muestra por primera que el desacoplamiento de la eNOS en respuesta a unos niveles elevados de aldosterona podría resultar en una disminución de la biogénesis mitocondrial a nivel vascular.

3.2. El tratamiento con proantocianidinas regula la expresión de los mediadores implicados en el proceso de biogénesis mitocondrial vascular tras la administración de aldosterona.

Por otro lado, el tratamiento con proantocianidinas aumentó significativamente la expresión vascular tanto de SIRT1 como de PGC1 α en el grupo ALDO+P80 en comparación con el grupo ALDO. Estudios previos *in vitro* e *in vivo* así como ensayos clínicos, han puesto de manifiesto que compuestos ricos en polifenoles tales como el resveratrol actúan modulando y activando a SIRT1 (456-458). En concreto, un estudio

en un modelo experimental de hipertensión demostró que la administración crónica de proantocianidinas procedentes de semilla de uva resultaba en un aumento de la expresión vascular de la eNOS y de SIRT1, así como en la regulación de la presión arterial (459). Así mismo, se observó en un modelo experimental de nefropatía diabética que el tratamiento con proantocianidinas mejoraba dicha patología a través de la activación de la vía de señalización de SIRT1 y el aumento de la expresión renal proteica tanto de SIRT1 como de PGC1 α . Por tanto se postuló que la activación de la vía de señalización de SIRT1-PGC1 α por las proantocianidinas podría estar inhibiendo el estrés oxidativo y previniendo la disfunción mitocondrial causada por la nefropatía diabética, mejorando así la patología renal (460).

En el presente estudio, el tratamiento con proantocianidinas aumentó la expresión proteica vascular de NRF1 y TFAM en el grupo ALDO+P80 en comparación con el grupo ALDO. Estudios previos han demostrado los efectos beneficiosos del uso de polifenoles sobre el proceso de biogénesis mitocondrial (461-463). En un estudio en un modelo experimental de obesidad y de sus alteraciones cardiometabólicas asociadas se observó que la administración de epicatequina resultaba en un aumento de la expresión proteica en tejido adiposo y muscular esquelético de SIRT1, PGC1 α y TFAM así como en la modulación de la presión arterial. Por tanto, se propuso que el tratamiento con epicatequina podría estar mejorando la función mitocondrial y las alteraciones cardiometabólicas asociadas a la obesidad (463). Así mismo, se observó en un ensayo que la incubación de CE control con una combinación de resveratrol y equol resultaba en el aumento de expresión de factores tales como SIRT1, PGC1 α , TFAM y NRF1, con respecto a los resultados obtenidos en la incubación de las CE con ambos polifenoles de manera independiente. Estas evidencias permitieron sugerir que la modulación del

proceso de biogénesis mitocondrial podría participar en el mantenimiento de una correcta función endotelial (462).

En nuestro estudio, hemos descrito por primera vez el aumento de la expresión proteica vascular de SIRT1, PGC1 α , TFAM y NRF1 en respuesta al tratamiento con proantocianidinas en ratas a las que se les administró aldosterona. Los presentes resultados sugieren que las proantocianidinas podrían estar actuando como moduladores de la biogénesis mitocondrial vascular, mejorando así alteraciones vasculares asociadas como el estrés oxidativo, la disfunción endotelial, la hipertensión y la hipertrofia de la pared arterial.

3.3. La administración de aldosterona altera la expresión de los mediadores implicados en el proceso de remodelado mitocondrial vascular.

La expresión proteica vascular de la MFN1 disminuyó significativamente en el grupo ALDO en comparación con el grupo CONTROL. La MFN1 es uno de los principales mediadores de la fusión de la membrana mitocondrial externa (464). Estudios previos en miocitos ventriculares de cultivo primario de rata estimulados con PE y en un modelo experimental de hipertrofia cardiaca, mostraron una disminución de la expresión del mediador de fusión mitocondrial MFN2 (465, 466). A su vez, se observó la disminución de la expresión cardiaca de los tres principales mediadores de fusión mitocondrial MFN1, MFN2 y OPA1 en un modelo experimental de hipertensión (237, 467). Los datos obtenidos en los estudios descritos permitieron sugerir que durante el desarrollo de

hipertensión el equilibrio entre los ciclos de fusión y fisión se podría ver alterado, favoreciéndose el aumento de la fragmentación mitocondrial (237). En el presente trabajo se muestra por primera vez el efecto del hiperaldosteronismo sobre la expresión de la MFN1 en aorta. Este resultado sugiere que los niveles elevados de aldosterona podrían actuar disminuyendo el proceso de fusión de la membrana mitocondrial externa a nivel vascular por medio de la reducción del mediador de fusión MFN1.

La disminución de la expresión proteica vascular de la MFN1 se vio acompañada por alteraciones en la expresión de las isoformas L y S de OPA1. La expresión vascular de L-OPA1 disminuyó, mientras que la de la S-OPA1 aumentó en el grupo ALDO en comparación con el grupo CONTROL. El presente trabajo muestra por primera vez los efectos de la aldosterona sobre la regulación de OPA1 a nivel vascular. La proteína OPA1 se encarga del mantenimiento de las crestas mitocondriales (464), así como de promover la fusión de la membrana mitocondrial interna (468). Se ha demostrado en un estudio previo llevado a cabo tanto en un modelo experimental como en pacientes con insuficiencia cardiaca, que dicha patología cursa con una disminución de la expresión de la proteína OPA1 cardiaca (469). En dicho estudio, se observó a su vez una disminución del tamaño y un aumento de la fragmentación mitocondrial, indicando una disminución del proceso de fusión mitocondrial a nivel cardiaco (469). Otro estudio llevado a cabo en un modelo experimental de ratones +/- para OPA1 mostró que dichos animales presentaban mitocondrias de mayor tamaño con alteraciones en la estructura de las crestas mitocondriales a nivel cardiaco. Estas alteraciones dieron lugar al desarrollo de disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y miocardiopatía (470). Por otro lado, el desarrollo de hipertensión se ha relacionado con la disfunción mitocondrial (237, 471, 472). Así, un estudio epidemiológico demostró que variaciones genéticas en el marcador

de fusión mitocondrial OPA1 se relacionaban con el desarrollo de hipertensión de manera dependiente a la edad (471). Los datos recogidos en la literatura junto con los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que las alteraciones en los procesos que componen la dinámica mitocondrial, sobre todo en los procesos relacionados con la fusión mitocondrial, podrían desempeñar un papel importante en la patogenia de la hipertensión arterial.

La administración de aldosterona produjo la sobreexpresión de OMA1 vascular en las ratas del grupo ALDO en comparación con las ratas CONTROL. El presente trabajo describe por primera vez la expresión vascular de OMA1, así como su sobreexpresión en respuesta a niveles elevados de aldosterona. Un estudio en un modelo experimental de ratones *knockout* para *Yme1l* demostró que la delección de *Yme1l* aumentaba el procesamiento proteolítico de L-OPA1 debido a la activación de OMA1 a nivel cardiaco. El aumento del procesamiento de L-OPA1 dio lugar a un aumento de la fragmentación mitocondrial en el corazón de dichos animales, favoreciendo el desarrollo de alteraciones como la miocardiopatía dilatada y la insuficiencia cardiaca (473). En el citado estudio, también se puso de manifiesto que la delección de OMA1 constituía un mecanismo de protección frente a la muerte celular y la insuficiencia cardiaca (473). El presente trabajo muestra por primera vez el papel de la aldosterona en la regulación de OPA1 y OMA1 a nivel vascular. Los niveles exacerbados de aldosterona podrían constituir una situación de estrés que estimularía la expresión y la actividad de OMA1 en la aorta de los animales estudiados. La activación de OMA1 tendría como resultado el aumento del procesamiento de L-OPA1 en sus fragmentos de menor tamaño S-OPA1, favoreciendo así el proceso de fisión mitocondrial a nivel vascular.

La administración de aldosterona también resultó en el aumento de expresión proteica vascular de DRP1 en el grupo ALDO con respecto al grupo CONTROL. Este trabajo muestra por primera vez la regulación de DRP1 a nivel vascular en presencia de niveles elevados de aldosterona. El proceso de fisión mitocondrial parece estar relacionado con el desarrollo de algunas patologías cardíacas en diferentes modelos experimentales (235). Estudios llevados a cabo en una línea celular de músculo cardíaco y en un modelo experimental de isquemia cardíaca, demostraron que la inhibición de DRP1 y por tanto de la fisión mitocondrial resultaba beneficiosa. Los efectos beneficiosos observados permitieron sugerir que la inhibición de DRP1 y la disminución de la fisión mitocondrial podrían ejercer un efecto cardioprotector mediante la reducción del metabolismo mitocondrial, aumentado tras producirse una isquemia-reperfusión (474, 475). Otro estudio en un modelo experimental de ratones con infarto de miocardio demostró que era posible bloquear la traslocación de DRP1 a la mitocondria. En consecuencia, el proceso de fisión mitocondrial se vio inhibido, resultando esto último beneficioso para la patología de infarto de miocardio en ratones (476). Así mismo, en un cultivo primario de cardiomiocitos, en un modelo cardíaco *ex vivo*, y en un modelo experimental de infarto de miocardio se observó que la inhibición de la fisión mitocondrial resultaba en la mejora de la disfunción cardíaca (477). Actualmente no se conocen numerosos datos sobre la regulación de DRP1 a nivel vascular, sin embargo, el presente trabajo muestra el papel de dicho mediador de fisión en la dinámica mitocondrial a nivel vascular en un modelo de hiperaldosteronismo. Nuestros resultados sugieren que niveles elevados de aldosterona actuarían incrementando la expresión del mediador de fisión DRP1, y que por tanto, podrían estar favoreciendo el proceso de fisión mitocondrial a nivel vascular.

En el presente trabajo observamos una disminución de la expresión de los mediadores de fusión MFN1 y L-OPA1 y un aumento de la expresión de los mediadores de fisión S-OPA1, OMA1 y DRP1 en respuesta a niveles elevados de aldosterona. Los presentes resultados sugieren por tanto que el hiperaldosteronismo actuaría alterando el equilibrio de los procesos de remodelado mitocondrial, favoreciendo el proceso de fisión mitocondrial a nivel vascular. El incremento de la fisión mitocondrial podría dar lugar a mitocondrias disfuncionales que participarían en el desarrollo de patologías vasculares tales como el aumento del estrés oxidativo, la disfunción endotelial y la hipertensión.

3.4. El tratamiento con proantocianidinas modula la expresión de los mediadores implicados en el proceso de remodelado mitocondrial vascular, alterada tras la administración de aldosterona.

Actualmente, el diseño de nuevas terapias que regulen la morfología mitocondrial constituye un interesante tema de estudio. Diversos estudios sugieren que la inhibición de la fisión y la activación de los factores que regulan la fusión; como son las MFNs y OPA1; podrían constituir una novedosa estrategia terapéutica contra ECV tales como la insuficiencia cardiaca, la hipertrofia cardiaca y la hipertensión arterial (478).

Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con proantocianidinas resultó en el aumento de expresión proteica vascular de la MFN1 en el grupo ALDO+P80 con respecto al grupo ALDO. A su vez, el tratamiento con proantocianidinas normalizó la expresión proteica vascular de OPA1, observándose un aumento de la isoforma L-OPA1 y una disminución de la isoforma S-OPA1 en el grupo ALDO+P80 en comparación con el grupo ALDO. Por otro lado, el tratamiento con proantocianidinas produjo una disminución de la expresión proteica de DRP1 y de OMA1 a nivel vascular en el grupo ALDO+P80 en comparación con el grupo ALDO. Existen pocos estudios acerca del efecto que ejercen los polifenoles sobre los procesos de remodelado mitocondrial a nivel cardiovascular, constituyendo el presente trabajo un punto de partida en este campo. Estudios previos sí han demostrado el efecto de ciertos polifenoles en la modulación de la fusión y la fisión mitocondrial en diversos modelos experimentales de neurodegeneración. Dichos estudios demostraron que el tratamiento con polifenoles como el resveratrol y la curcumina además de aumentar la biogénesis mitocondrial, era capaz de mejorar la disfunción mitocondrial. Además se observó un aumento de la expresión de los marcadores de fusión mitocondrial OPA1 y MFN1, así como una disminución de los marcadores de fisión mitocondrial DRP1 y Fis1 en el cuerpo estriado de dichos animales con neurodegeneración (479, 480). El presente trabajo, muestra por primera vez el efecto que ejercen las proantocianidinas sobre los ciclos de fusión y fisión mitocondrial a nivel vascular, observándose una regulación positiva de los marcadores de fusión y una regulación negativa de los marcadores de fisión mitocondrial. Los presentes resultados sugieren que el tratamiento con proantocianidinas estaría previniendo el aumento de la fisión mitocondrial en aorta inducida por la administración de aldosterona, favoreciendo por otro lado el proceso de fusión mitocondrial a nivel

vascular. El aumento de la fusión mitocondrial a nivel vascular podría estar a su vez previniendo el aumento del estrés oxidativo asociado a la disfunción mitocondrial. La regulación que ejercen las proantocianidinas sobre los procesos de remodelado mitocondrial podría constituir por tanto otro mecanismo de defensa frente al desarrollo de patologías tales como el estrés oxidativo, la disfunción vascular y la hipertensión arterial observadas en el presente trabajo.

3.5. La administración de aldosterona disminuye la expresión del mediador de mitofagia PINK1.

La aldosterona disminuyó significativamente la expresión proteica vascular de PINK1 en el grupo ALDO en comparación con el grupo CONTROL. PINK1 constituye un factor clave en la regulación del proceso de mitofagia a nivel celular (481). La eliminación correcta de las mitocondrias dañadas o disfuncionales es fundamental para proteger a la célula de la liberación de proteínas proapoptóticas y de una producción excesiva de EROs mitocondriales que pueden exacerbar el daño vascular (288, 482, 483). La mitofagia contribuye al mantenimiento correcto tanto de la cantidad como de la calidad mitocondrial a nivel cardiovascular (484). En condiciones fisiológicas, el proceso de fisión mitocondrial es necesario para que tenga lugar posteriormente el de mitofagia (255). Un estudio *in vitro* con cardiomiocitos modificados genéticamente deficientes para DRP1 ha puesto de manifiesto el papel sinérgico entre el proceso de fisión y el proceso de mitofagia en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial a nivel cardiaco (485). El desequilibrio entre los procesos de fisión y de mitofagia mitocondrial da lugar a la

aparición de mitocondrias disfuncionales que pueden conducir a la muerte celular (486). Estudios previos demostraron que el proceso de mitofagia era inhibido a nivel cardiaco en modelos experimentales de diabetes tipo 1 (487-489) y tipo 2, así como con diferentes manifestaciones de síndrome metabólico (490-492). Dichos estudios sugirieron por tanto que la inhibición de la mitofagia podría contribuir al desarrollo de patologías cardiovasculares como la miocardiopatía diabética (493). Los presentes resultados muestran por primera vez la regulación del proceso de mitofagia a nivel vascular en un modelo experimental de hiperaldosteronismo. De esta forma, la disminución de la expresión de PINK1 en respuesta a niveles exacerbados de aldosterona podría dar lugar a una disminución del proceso de mitofagia a nivel vascular. Como se ha nombrado anteriormente, la administración de aldosterona resultó en un aumento de la fisión mitocondrial. Tomado en conjunto, los presentes resultados podrían sugerir que el aumento de la fisión mitocondrial y la disminución de la mitofagia estarían favoreciendo el mantenimiento de las mitocondrias dañadas y/o disfuncionales en la pared vascular. Dichas mitocondrias disfuncionales actuarían liberando gran cantidad de EROs y por tanto incrementando el estrés oxidativo y favoreciendo el desarrollo de patologías como la hipertensión arterial, la inflamación y la disfunción endotelial a nivel vascular.

3.6. El tratamiento con proantocianidinas aumenta la expresión del mediador de mitofagia PINK1 tras la administración de aldosterona.

Por otra parte, el tratamiento con proantocianidinas aumentó significativamente la expresión proteica de PINK1 en la aorta de los animales ALDO+P80 con respecto a los animales pertenecientes al grupo ALDO. Estudios previos han puesto de manifiesto que los polifenoles son beneficiosos para el mantenimiento de una correcta dinámica mitocondrial, ya que facilitan la mitofagia, y por tanto la eliminación de las mitocondrias dañadas y/o disfuncionales (494, 495). En esta misma línea, se ha demostrado en modelos *in vitro* de daño cardíaco que compuestos como el resveratrol y la quercetina son capaces de aumentar la mitofagia potenciando la expresión de PARKIN y PINK1 (496, 497). El presente trabajo muestra por primera vez que el tratamiento con proantocianidinas regula positivamente la expresión de PINK1 a nivel vascular. El tratamiento con proantocianidinas podría estar aumentando el proceso de mitofagia, facilitando así la eliminación de las mitocondrias disfuncionales, presentes en la pared vascular como consecuencia del exceso de aldosterona. La eliminación de las mitocondrias dañadas y/o disfuncionales contribuiría a la prevención del desarrollo de alteraciones vasculares como el estrés oxidativo, la disfunción endotelial y la hipertensión arterial.

3.7. La administración de aldosterona altera la respuesta antioxidante mitocondrial.

En el presente estudio, la administración de aldosterona resultó en la disminución de la expresión proteica de SOD2 a nivel vascular en los animales del grupo ALDO en comparación con los animales del grupo CONTROL. El exceso en la liberación de EROs, especialmente de $\cdot\text{O}_2^-$, desempeña un papel fundamental en el desarrollo de diversas patologías cardiovasculares como la hipertensión (498-500). Bajo diversas condiciones fisiopatológicas, como pueden ser los niveles elevados de aldosterona, la SOD2 desempeña un papel importante en la regulación de la función endotelial y en el desarrollo de hipertensión arterial (222). Un estudio previo en un modelo experimental de ratones ApoE deficientes relacionó la disminución de expresión de SOD2 a nivel vascular con el desarrollo de disfunción endotelial debido al incremento de $\cdot\text{O}_2^-$ y al daño mitocondrial producido (501). Así mismo, otro estudio en un modelo experimental de hipertensión describió que la deficiencia total o parcial de SOD2 producía el desarrollo de patologías tales como la miocardiopatía y la hipertensión arterial (502). Otro estudio en un modelo experimental de hipertensión en respuesta a la administración de Ang II relacionó la sobreexpresión de SOD2 con la mejora de la función endotelial y la reducción tanto de la hipertensión como del estrés oxidativo (503). Así mismo, en un modelo experimental de diabetes tipo 2 observó que el uso de antagonistas del RM como la espironolactona aumentaba la expresión vascular de la SOD2, disminuyendo así el estrés oxidativo y previniendo la disfunción vascular asociada a la patología (504).

La disminución de la expresión de SOD2, estuvo acompañada por un aumento de la expresión en aorta de la subunidad p22phox de la NADPHox en el grupo ALDO en

comparación con el grupo CONTROL. En situaciones fisiopatológicas, como es la sobre-activación del SRAA, la mitocondria constituye la principal fuente de estrés oxidativo y el sistema NADPHox es sobreactivado de forma secundaria en respuesta a las EROs mitocondriales (222). El presente resultado sugiere que los niveles elevados de aldosterona actuarían disminuyendo la expresión proteica vascular de la SOD2 y reduciendo por tanto la capacidad antioxidante de las mitocondrias. El exceso de aldosterona estaría favoreciendo el desarrollo de estrés oxidativo a nivel vascular, el cual desempeña un papel fundamental en la aparición y el desarrollo de patologías vasculares tales como la hipertensión y la disfunción endotelial observadas en el presente trabajo.

3.8. El tratamiento con proantocianidinas mejora la respuesta antioxidante mitocondrial tras la administración de aldosterona.

Por otro lado, el tratamiento con proantocianidinas aumentó significativamente la expresión de SOD2 a nivel vascular en el grupo ALDO+P80 en comparación con el grupo ALDO. Estudios previos han demostrado que el tratamiento con proantocianidinas se asocia con el aumento de expresión y/o de actividad de diversas enzimas antioxidantes, entre ellas las SODs (327). Así, se ha puesto de manifiesto la capacidad antioxidante de los polifenoles, los cuales producen el aumento de la expresión plasmática de la SOD2 en sujetos control (505). También se ha demostrado la eficacia de antioxidantes naturales como la epicatequina en pacientes con diabetes tipo

2 e insuficiencia cardiaca, observándose un aumento de la expresión y actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa y la SOD2, así como una reducción del estrés oxidativo (506). El presente resultado muestra por primera vez la regulación positiva que ejercen las proantocianidinas sobre la expresión vascular de la SOD2 en un modelo experimental de hiperaldosteronismo. Estos resultados sugieren que las proantocianidinas actuarían estimulando la síntesis de enzimas antioxidantes, entre ellas la SOD2, y mejorarían por tanto la defensa antioxidante a nivel vascular, disminuyendo así el estrés oxidativo y las alteraciones asociadas observadas en el presente trabajo.

Resumen y Conclusiones

7. RESUMEN DE RESULTADOS

1. La administración de aldosterona elevó la presión arterial y produjo disfunción endotelial, remodelado vascular y aumento del contenido de colágeno en la pared de la aorta.
2. La administración de aldosterona modificó la expresión de marcadores de estrés oxidativo (p22phox, eNOS), inflamatorios (TNF α) y pro-fibróticos (CTGF) a nivel vascular.
3. El tratamiento con P80 previno las alteraciones mencionadas anteriormente.
4. La administración de aldosterona aumentó la expresión vascular del SGK1, de pNedd4-2 y de las tres subunidades del ENaC (α , β y γ).
5. El tratamiento con P80 redujo la expresión vascular del SGK1 y modificó las alteraciones sobre la expresión vascular de los mediadores ENaC y Nedd4-2 producidas por la administración de aldosterona en ratas.
6. La administración de aldosterona alteró la expresión vascular de los mediadores implicados en los procesos de: biogénesis mitocondrial (SIRT1, PGC1 α y TFAM), fusión y fisión mitocondrial (MFN1, DRP1, OMA1 y OPA1) y mitofagia (PINK1).
7. El tratamiento con P80 fue capaz de prevenir las alteraciones vasculares sobre la expresión de los mediadores implicados en los procesos de la dinámica mitocondrial producidos por la administración de aldosterona en ratas.

8. CONCLUSIONES

1. El tratamiento con un extracto rico en proantocianidinas modifica la expresión de los mediadores implicados en el transporte celular de sodio en la aorta de ratas tratadas con aldosterona, probablemente a través de la disminución de la expresión del SGK1. Por tanto, las proantocianidinas a través de sus efectos sobre la regulación del transporte celular de sodio, podrían prevenir el desarrollo de las alteraciones vasculares funcionales, morfológicas y moleculares producidas por la aldosterona en ratas.
2. Los efectos beneficiosos de las proantocianidinas sobre las alteraciones de la dinámica mitocondrial a nivel vascular producidas por la aldosterona, podrían estar relacionadas con la mejora de las alteraciones vasculares funcionales, morfológicas y moleculares mencionadas.
3. El bloqueo de la sobreexpresión aórtica del SGK1 con el tratamiento con proantocinidinas en las ratas a las que se les había administrado aldosterona, sustenta la hipótesis de que las proantocianidinas estarían ejerciendo sus efectos mediante el bloqueo del receptor de mineralocorticoides. Por tanto, cabría proponer que las proantocianidinas podrían constituir una alternativa terapéutica a los antagonistas clásicos del receptor de mineralocorticoides para la prevención de las alteraciones vasculares asociadas al hiperaldosteronismo.



Bibliografía

- 1.Nerem RM. Vascular fluid mechanics, the arterial wall, and atherosclerosis. Journal of biomechanical engineering. 1992;114(3):274-82.
- 2.Gussenhoven EJ, Essed CE, Lancee CT, Mastik F, Frietman P, van Egmond FC, et al. Arterial wall characteristics determined by intravascular ultrasound imaging: an in vitro study. Journal of the American College of Cardiology. 1989;14(4):947-52.
- 3.Avolio A. Genetic and environmental factors in the function and structure of the arterial wall. Hypertension. 1995;26(1):34-7.
- 4.Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. The American journal of cardiology. 2002;90(10c):40I-8I.
- 5.Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? Circulation. 2004;109(21 Suppl 1):II27-33.
- 6.Harvey A, Montezano AC, Lopes RA, Rios F, Touyz RM. Vascular Fibrosis in Aging and Hypertension: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. The Canadian journal of cardiology. 2016;32(5):659-68.
- 7.Xu J, Shi GP. Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. Biochimica et biophysica acta. 2014;1842(11):2106-19.
- 8.Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. Physiological reviews. 2009;89(3):957-89.
- 9.Simpson SA, Tait JF, Wettstein A, Neher R, Von Euw J, Reichstein T. [Isolation from the adrenals of a new crystalline hormone with especially high effectiveness on mineral metabolism]. Experientia. 1953;9(9):333-5.
- 10.Neville AM, O'Hare MJ. Functional activity of the adrenal cortex. Springer-Verlag1982. p. 30.

- 11.Cherradi N, Brandenburger Y, Capponi AM. Mitochondrial regulation of mineralocorticoid biosynthesis by calcium and the StAR protein. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 1998;139(3):249-56.
- 12.Shinzawa K, Ishibashi S, Murakoshi M, Watanabe K, Kominami S, Kawahara A, et al. Relationship between zonal distribution of microsomal cytochrome P-450s (P-450(17)alpha,lyase and P-450C21) and steroidogenic activities in guinea-pig adrenal cortex. *The Journal of endocrinology*. 1988;119(2):191-200.
- 13.Ferrario CM, Schiffrin EL. Role of mineralocorticoid receptor antagonists in cardiovascular disease. *Circulation research*. 2015;116(1):206-13.
- 14.Williams GH. Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. *Heart failure reviews*. 2005;10(1):7-13.
- 15.Connell JM, Davies E. The new biology of aldosterone. *The Journal of endocrinology*. 2005;186(1):1-20.
- 16.MacKenzie SM, Connell JM, Davies E. Non-adrenal synthesis of aldosterone: a reality check. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012;350(2):163-7.
- 17.Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, Iki K, Hatakeyama H, Blair IA, et al. Synthesis of corticosterone in the vascular wall. *Endocrinology*. 1994;135(5):2283-6.
- 18.Lombes M, Alfaidy N, Eugene E, Lessana A, Farman N, Bonvalet JP. Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation*. 1995;92(2):175-82.
- 19.Taves MD, Gomez-Sanchez CE, Soma KK. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2011;301(1):E11-24.

20. Takeda Y. Vascular synthesis of aldosterone: role in hypertension. *Molecular and cellular endocrinology*. 2004;217(1-2):75-9.
21. Morris DJ. The metabolism and mechanism of action of aldosterone. *Endocrine reviews*. 1981;2(2):234-47.
22. Jaisser F, Farman N. Emerging Roles of the Mineralocorticoid Receptor in Pathology: Toward New Paradigms in Clinical Pharmacology. *Pharmacological reviews*. 2016;68(1):49-75.
23. Odermatt A, Kratschmar DV. Tissue-specific modulation of mineralocorticoid receptor function by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: an overview. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012;350(2):168-86.
24. Gekle M, Bretschneider M, Meinel S, Ruhs S, Grossmann C. Rapid mineralocorticoid receptor trafficking. *Steroids*. 2014;81:103-8.
25. Martin-Fernandez B, Valero Munoz M, de las Heras N, Ballesteros S, Lahera V. Relevance of SGK1 in structural, functional and molecular alterations produced by aldosterone in heart. *Hormone molecular biology and clinical investigation*. 2014;18(2):53-61.
26. Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombes M. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nuclear receptor signaling*. 2007;5:e012.
27. Trapp T, Holsboer F. Ligand-induced conformational changes in the mineralocorticoid receptor analyzed by protease mapping. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;215(1):286-91.
28. Robert-Nicoud M, Flahaut M, Elalouf JM, Nicod M, Salinas M, Bens M, et al. Transcriptome of a mouse kidney cortical collecting duct cell line: effects of aldosterone

and vasopressin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001;98(5):2712-6.

29.Meijer OC, Williamson A, Dallman MF, Pearce D. Transcriptional repression of the 5-HT1A receptor promoter by corticosterone via mineralocorticoid receptors depends on the cellular context. Journal of neuroendocrinology. 2000;12(3):245-54.

30.Verrey F. Transcriptional control of sodium transport in tight epithelial by adrenal steroids. The Journal of membrane biology. 1995;144(2):93-110.

31.Kritis AA, Gouta CP, Liaretidou EI, Kallaras KI. Latest aspects of aldosterone actions on the heart muscle. Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society. 2016;67(1):21-30.

32.Fanestil DD. Mechanism of action of aldosterone. Annual review of medicine. 1969;20:223-32.

33.Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL. Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. Molecular and cellular biology. 1993;13(4):2031-40.

34.Lang F, Artunc F, Vallon V. The physiological impact of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. Current opinion in nephrology and hypertension. 2009;18(5):439-48.

35.Satoh N, Nakamura M, Suzuki M, Suzuki A, Seki G, Horita S. Roles of Akt and SGK1 in the Regulation of Renal Tubular Transport. BioMed research international. 2015;2015:971697.

36.McCormick JA, Bhalla V, Pao AC, Pearce D. SGK1: a rapid aldosterone-induced regulator of renal sodium reabsorption. Physiology (Bethesda, Md). 2005;20:134-9.

- 37.Lang F, Shumilina E. Regulation of ion channels by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013;27(1):3-12.
- 38.Terada Y, Kuwana H, Kobayashi T, Okado T, Suzuki N, Yoshimoto T, et al. Aldosterone-stimulated SGK1 activity mediates profibrotic signaling in the mesangium. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2008;19(2):298-309.
- 39.Fejes-Toth G, Pearce D, Naray-Fejes-Toth A. Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(6):2973-8.
- 40.Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K, Purdy TM, Funder JW, Pearce D, et al. The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology*. 2001;142(4):1587-94.
- 41.Kashlan OB, Kleyman TR. ENaC structure and function in the wake of a resolved structure of a family member. *American journal of physiology Renal physiology*. 2011;301(4):F684-96.
- 42.Rossier BC. Epithelial sodium channel (ENaC) and the control of blood pressure. *Current opinion in pharmacology*. 2014;15:33-46.
- 43.Kamynina E, Staub O. Concerted action of ENaC, Nedd4-2, and Sgk1 in transepithelial Na(+) transport. *American journal of physiology Renal physiology*. 2002;283(3):F377-87.
- 44.Galiana-Simal A, Olivares-Alvaro E, Klett-Mingo M, Ruiz-Roso MB, Ballesteros S, de Las Heras N, et al. Proanthocyanidins block aldosterone-dependent up-regulation of cardiac gamma ENaC and Nedd4-2 inactivation via SGK1. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2016;37:13-9.

- 45.Butterworth MB. Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by membrane trafficking. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1802(12):1166-77.
- 46.Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(7):R19-23.
- 47.Chen L, Zhang X, Zhang W. Regulation of alphaENaC transcription. *Vitamins and hormones*. 2015;98:101-35.
- 48.Lee IH, Campbell CR, Cook DI, Dinudom A. Regulation of epithelial Na⁺ channels by aldosterone: role of Sgk1. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2008;35(2):235-41.
- 49.Dooley R, Harvey BJ, Thomas W. Non-genomic actions of aldosterone: from receptors and signals to membrane targets. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012;350(2):223-34.
- 50.Thomas CP, Itani OA. New insights into epithelial sodium channel function in the kidney: site of action, regulation by ubiquitin ligases, serum- and glucocorticoid-inducible kinase and proteolysis. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2004;13(5):541-8.
- 51.Sayegh R, Auerbach SD, Li X, Loftus RW, Husted RF, Stokes JB, et al. Glucocorticoid induction of epithelial sodium channel expression in lung and renal epithelia occurs via trans-activation of a hormone response element in the 5'-flanking region of the human epithelial sodium channel alpha subunit gene. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(18):12431-7.
- 52.Jespersen T, Membrez M, Nicolas CS, Pitard B, Staub O, Olesen SP, et al. The KCNQ1 potassium channel is down-regulated by ubiquitylating enzymes of the Nedd4/Nedd4-like family. *Cardiovascular research*. 2007;74(1):64-74.

53. Donovan P, Poronnik P. Nedd4 and Nedd4-2: ubiquitin ligases at work in the neuron. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(3):706-10.
54. Gille T, Randrianarison-Pellan N, Goolaerts A, Dard N, Uzunhan Y, Ferrary E, et al. Hypoxia-induced inhibition of epithelial Na(+) channels in the lung. Role of Nedd4-2 and the ubiquitin-proteasome pathway. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2014;50(3):526-37.
55. Rizzo F, Staub O. NEDD4-2 and salt-sensitive hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2015;24(2):111-6.
56. Goel P, Manning JA, Kumar S. NEDD4-2 (NEDD4L): the ubiquitin ligase for multiple membrane proteins. *Gene*. 2015;557(1):1-10.
57. Kamynina E, Debonneville C, Bens M, Vandewalle A, Staub O. A novel mouse Nedd4 protein suppresses the activity of the epithelial Na⁺ channel. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001;15(1):204-14.
58. Arroyo JP, Lagnaz D, Ronzaud C, Vazquez N, Ko BS, Moddes L, et al. Nedd4-2 modulates renal Na⁺-Cl⁻ cotransporter via the aldosterone-SGK1-Nedd4-2 pathway. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(9):1707-19.
59. Guo J, Wang T, Li X, Shallow H, Yang T, Li W, et al. Cell surface expression of human ether-a-go-go-related gene (hERG) channels is regulated by caveolin-3 protein via the ubiquitin ligase Nedd4-2. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(40):33132-41.
60. An H, Krist DT, Statsyuk AV. Crosstalk between kinases and Nedd4 family ubiquitin ligases. *Molecular bioSystems*. 2014;10(7):1643-57.

61.Faresse N, Lagnaz D, Debonneville A, Ismailji A, Maillard M, Fejes-Toth G, et al. Inducible kidney-specific Sgk1 knockout mice show a salt-losing phenotype. *American journal of physiology Renal physiology*. 2012;302(8):F977-85.

62.Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, et al. Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(5):2514-9.

63.Diakov A, Korbmacher C. A novel pathway of epithelial sodium channel activation involves a serum- and glucocorticoid-inducible kinase consensus motif in the C terminus of the channel's alpha-subunit. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(37):38134-42.

64.Diakov A, Nesterov V, Mokrushina M, Rauh R, Korbmacher C. Protein kinase B alpha (PKBalpha) stimulates the epithelial sodium channel (ENaC) heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocytes by two distinct mechanisms. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2010;26(6):913-24.

65.Hallows KR, Bhalla V, Oyster NM, Wijngaarden MA, Lee JK, Li H, et al. Phosphopeptide screen uncovers novel phosphorylation sites of Nedd4-2 that potentiate its inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(28):21671-8.

66.Lang F, Stournaras C. Serum and glucocorticoid inducible kinase, metabolic syndrome, inflammation, and tumor growth. *Hormones (Athens, Greece)*. 2013;12(2):160-71.

67.Chandran S, Li H, Dong W, Krasinska K, Adams C, Alexandrova L, et al. Neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 4-2 (Nedd4-2) regulation by 14-3-3 protein binding at canonical serum and glucocorticoid kinase 1 (SGK1) phosphorylation sites. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(43):37830-40.

68. Bhalla V, Daidie D, Li H, Pao AC, LaGrange LP, Wang J, et al. Serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 regulates ubiquitin ligase neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated protein 4-2 by inducing interaction with 14-3-3. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md). 2005;19(12):3073-84.
69. Lang F, Stournaras C, Alesutan I. Regulation of transport across cell membranes by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Molecular membrane biology*. 2014;31(1):29-36.
70. Wehling M, Eisen C, Christ M. Aldosterone-specific membrane receptors and rapid non-genomic actions of mineralocorticoids. *Molecular and cellular endocrinology*. 1992;90(1):C5-9.
71. Williams JS. Evolving research in nongenomic actions of aldosterone. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2013;20(3):198-203.
72. Bassett MH, White PC, Rainey WE. The regulation of aldosterone synthase expression. *Molecular and cellular endocrinology*. 2004;217(1-2):67-74.
73. Sonoyama T, Sone M, Tamura N, Honda K, Taura D, Kojima K, et al. Role of endogenous ACTH on circadian aldosterone rhythm in patients with primary aldosteronism. *Endocrine connections*. 2014;3(4):173-9.
74. Hattangady NG, Olala LO, Bollag WB, Rainey WE. Acute and chronic regulation of aldosterone production. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012;350(2):151-62.
75. Conn JW, Louis LH. Primary aldosteronism, a new clinical entity. *Annals of internal medicine*. 1956;44(1):1-15.
76. Briet M, Schiffrin EL. Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nature reviews Nephrology*. 2010;6(5):261-73.

77. Briet M, Schiffrin EL. Vascular actions of aldosterone. *Journal of vascular research*. 2013;50(2):89-99.

78. Cachofeiro V, Lopez-Andres N, Miana M, Martin-Fernandez B, de Las Heras N, Martinez E, et al. Aldosterone and the cardiovascular system: a dangerous association. *Hormone molecular biology and clinical investigation*. 2010;4(2):539-48.

79. Pasterkamp G, Galis ZS, de Kleijn DP. Expansive arterial remodeling: location, location, location. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(4):650-7.

80. Renna NF, de Las Heras N, Miatello RM. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *International journal of hypertension*. 2013;2013:808353.

81. Weber KT, Anversa P, Armstrong PW, Brilla CG, Burnett JC, Jr., Cruickshank JM, et al. Remodeling and reparation of the cardiovascular system. *Journal of the American College of Cardiology*. 1992;20(1):3-16.

82. Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, Takeda Y, Takeda R, Yamamoto H. Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(39):24316-20.

83. Pu Q, Neves MF, Viridis A, Touyz RM, Schiffrin EL. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension*. 2003;42(1):49-55.

84. Park JB, Schiffrin EL. ET(A) receptor antagonist prevents blood pressure elevation and vascular remodeling in aldosterone-infused rats. *Hypertension*. 2001;37(6):1444-9.

85. Cachofeiro V, Miana M, de Las Heras N, Martin-Fernandez B, Ballesteros S, Fernandez-Tresguerres J, et al. Aldosterone and the vascular system. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2008;109(3-5):331-5.

86. Duprez DA. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review. *Journal of hypertension*. 2006;24(6):983-91.
87. Briet M, Barhoumi T, Mian MO, Coelho SC, Ouerd S, Rautureau Y, et al. Aldosterone-Induced Vascular Remodeling and Endothelial Dysfunction Require Functional Angiotensin Type 1a Receptors. *Hypertension*. 2016;67(5):897-905.
88. Sun Y. The renin-angiotensin-aldosterone system and vascular remodeling. *Congestive heart failure (Greenwich, Conn)*. 2002;8(1):11-6.
89. Koenig JB, Jaffe IZ. Direct role for smooth muscle cell mineralocorticoid receptors in vascular remodeling: novel mechanisms and clinical implications. *Current hypertension reports*. 2014;16(5):427.
90. Pruthi D, McCurley A, Aronovitz M, Galayda C, Karumanchi SA, Jaffe IZ. Aldosterone promotes vascular remodeling by direct effects on smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(2):355-64.
91. Oberleithner H. Aldosterone makes human endothelium stiff and vulnerable. *Kidney international*. 2005;67(5):1680-2.
92. Oberleithner H, Riethmuller C, Ludwig T, Hausberg M, Schillers H. Aldosterone remodels human endothelium. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2006;187(1-2):305-12.
93. Oberleithner H, Riethmuller C, Ludwig T, Shahin V, Stock C, Schwab A, et al. Differential action of steroid hormones on human endothelium. *Journal of cell science*. 2006;119(Pt 9):1926-32.
94. Rzucidlo EM, Martin KA, Powell RJ. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Journal of vascular surgery*. 2007;45 Suppl A:A25-32.

- 95.Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2002;8(11):1249-56.
- 96.Grammas P, Giacomelli F, Wiener J. Carotid artery constriction in acute hypertension. *The American journal of pathology*. 1981;103(2):226-33.
- 97.Dilley RJ, McGeachie JK, Prendergast FJ. A review of the proliferative behaviour, morphology and phenotypes of vascular smooth muscle. *Atherosclerosis*. 1987;63(2-3):99-107.
- 98.Patel R, Cardneau JD, Colles SM, Graham LM. Synthetic smooth muscle cell phenotype is associated with increased nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity: effect on collagen secretion. *Journal of vascular surgery*. 2006;43(2):364-71.
- 99.Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation*. 2003;107(1):139-46.
- 100.Lakatta EG. The reality of aging viewed from the arterial wall. *Artery research*. 2013;7(2):73-80.
- 101.Ishikawa Y, Asuwa N, Ishii T, Ito K, Akasaka Y, Masuda T, et al. Collagen alteration in vascular remodeling by hemodynamic factors. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2000;437(2):138-48.
- 102.Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*. 2001;38(3 Pt 2):581-7.

- 103.Izzard AS, Rizzoni D, Agabiti-Rosei E, Heagerty AM. Small artery structure and hypertension: adaptive changes and target organ damage. *Journal of hypertension*. 2005;23(2):247-50.
- 104.Ishizawa K, Izawa Y, Ito H, Miki C, Miyata K, Fujita Y, et al. Aldosterone stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via big mitogen-activated protein kinase 1 activation. *Hypertension*. 2005;46(4):1046-52.
- 105.Rizzoni D, Porteri E, Castellano M, Bettoni G, Muiesan ML, Muiesan P, et al. Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension*. 1996;28(5):785-90.
- 106.Stenmark KR, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E, Das M. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2006;21:134-45.
- 107.Stenmark KR, Yeager ME, El Kasmi KC, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya EV, Li M, et al. The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annual review of physiology*. 2013;75:23-47.
- 108.Torquato S, Maron BA, Aghamehammadzadeh R, Loscalzo J, Leopold JA. Aldosterone Activates Autophagy To Increase Fibroblast Collagen Synthesis and Vascular Stiffness. *The FASEB Journal*. 2013;27(1 Supplement):1188.9.
- 109.Kulenthiran S, Ewen S, Bohm M, Mahfoud F. Hypertension up to date: SPRINT to SPYRAL. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*. 2017.
- 110.Dutta RK, Soderkvist P, Gimm O. Genetics of primary hyperaldosteronism. *Endocrine-related cancer*. 2016;23(10):R437-54.
- 111.Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2013;127(1):143-52.

- 112.Olives C, Myerson R, Mokdad AH, Murray CJ, Lim SS. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in United States counties, 2001-2009. *PloS one*. 2013;8(4):e60308.
- 113.Ford ES. Trends in mortality from all causes and cardiovascular disease among hypertensive and nonhypertensive adults in the United States. *Circulation*. 2011;123(16):1737-44.
- 114.Catala-Lopez F, Sanfelix-Gimeno G, Garcia-Torres C, Ridao M, Peiro S. Control of arterial hypertension in Spain: a systematic review and meta-analysis of 76 epidemiological studies on 341 632 participants. *Journal of hypertension*. 2012;30(1):168-76.
- 115.Pickering TG. Mental stress as a causal factor in the development of hypertension and cardiovascular disease. *Current hypertension reports*. 2001;3(3):249-54.
- 116.Morimoto K, Morikawa M, Kimura H, Ishii N, Takamata A, Hara Y, et al. Mental stress induces sustained elevation of blood pressure and lipid peroxidation in postmenopausal women. *Life sciences*. 2008;82(1-2):99-107.
- 117.Ha SK. Dietary salt intake and hypertension. *Electrolyte & blood pressure : E & BP*. 2014;12(1):7-18.
- 118.Schmieder RE, Messerli FH, Garavaglia GE, Nunez BD. Dietary salt intake. A determinant of cardiac involvement in essential hypertension. *Circulation*. 1988;78(4):951-6.
- 119.Calhoun DA. Aldosteronism and hypertension. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2006;1(5):1039-45.

120. Johnson RJ, Feig DI, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Rodriguez-Iturbe B. Pathogenesis of essential hypertension: historical paradigms and modern insights. *Journal of hypertension*. 2008;26(3):381-91.
121. Cheung BM, Li C. Diabetes and hypertension: is there a common metabolic pathway? *Current atherosclerosis reports*. 2012;14(2):160-6.
122. Sutherland DJ, Ruse JL, Laidlaw JC. Hypertension, increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone. *Canadian Medical Association journal*. 1966;95(22):1109-19.
123. Williams GH, Hollenberg NK. Functional derangements in the regulation of aldosterone secretion in hypertension. *Hypertension*. 1991;18(5 Suppl):lii143-9.
124. Laragh JH. Relation of aldosterone secretion to hypertensive vascular disease. *Circulation research*. 1961;9:792-804.
125. Calhoun DA. Hyperaldosteronism as a common cause of resistant hypertension. *Annual review of medicine*. 2013;64:233-47.
126. Conn JW, Louis LH. Primary aldosteronism: a new clinical entity. *Transactions of the Association of American Physicians*. 1955;68:215-31; discussion, 31-3.
127. Gordon RD, Gomez-Sanchez CE, Hamlet SM, Tunny TJ, Klemm SA. Angiotensin-responsive aldosterone-producing adenoma masquerades as idiopathic hyperaldosteronism (IHA: adrenal hyperplasia) or low-renin essential hypertension. *Journal of hypertension Supplement : official journal of the International Society of Hypertension*. 1987;5(5):S103-6.
128. Galati SJ. Primary aldosteronism: challenges in diagnosis and management. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2015;44(2):355-69.

- 129.Vasan RS, Evans JC, Larson MG, Wilson PW, Meigs JB, Rifai N, et al. Serum aldosterone and the incidence of hypertension in nonhypertensive persons. *The New England journal of medicine*. 2004;351(1):33-41.
- 130.El-Gharbawy AH, Nadig VS, Kotchen JM, Grim CE, Sagar KB, Kaldunski M, et al. Arterial pressure, left ventricular mass, and aldosterone in essential hypertension. *Hypertension*. 2001;37(3):845-50.
- 131.Grim CE, Cowley AW, Jr., Hamet P, Gaudet D, Kaldunski ML, Kotchen JM, et al. Hyperaldosteronism and hypertension: ethnic differences. *Hypertension*. 2005;45(4):766-72.
- 132.Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *The New England journal of medicine*. 1999;341(10):709-17.
- 133.Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2003;348(14):1309-21.
- 134.Pitt B, White H, Nicolau J, Martinez F, Gheorghiade M, Aschermann M, et al. Eplerenone reduces mortality 30 days after randomization following acute myocardial infarction in patients with left ventricular systolic dysfunction and heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(3):425-31.
- 135.Hunt SA. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(6):e1-82.

- 136.Hadi HA, Carr CS, Al Suwaidi J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vascular health and risk management*. 2005;1(3):183-98.
- 137.Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovascular journal of Africa*. 2012;23(4):222-31.
- 138.Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharron JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol*. 2006;5:4.
- 139.Francois M, Kojda G. Effect of hypercholesterolemia and of oxidative stress on the nitric oxide-cGMP pathway. *Neurochemistry international*. 2004;45(6):955-61.
- 140.Toda N, Imamura T, Okamura T. Alteration of nitric oxide-mediated blood flow regulation in diabetes mellitus. *Pharmacology & therapeutics*. 2010;127(3):189-209.
- 141.Toda N, Arakawa K. Salt-induced hemodynamic regulation mediated by nitric oxide. *Journal of hypertension*. 2011;29(3):415-24.
- 142.Busse R, Fleming I. Nitric oxide, nitric oxide synthase, and hypertensive vascular disease. *Current hypertension reports*. 1999;1(1):88-95.
- 143.Toda N, Nakanishi S, Tanabe S. Aldosterone affects blood flow and vascular tone regulated by endothelium-derived NO: therapeutic implications. *British journal of pharmacology*. 2013;168(3):519-33.
- 144.Daiber A, Steven S, Weber A, Shuvaev VV, Muzykantov VR, Laher I, et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *British journal of pharmacology*. 2017;174(12):1591-619.
- 145.Dharmashankar K, Widlansky ME. Vascular endothelial function and hypertension: insights and directions. *Current hypertension reports*. 2010;12(6):448-55.

146. Farquharson CA, Struthers AD. Aldosterone induces acute endothelial dysfunction in vivo in humans: evidence for an aldosterone-induced vasculopathy. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2002;103(4):425-31.
147. Farquharson CA, Struthers AD. Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2000;101(6):594-7.
148. Liu SL, Schmuck S, Chorazczyewski JZ, Gros R, Feldman RD. Aldosterone regulates vascular reactivity: short-term effects mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation. *Circulation*. 2003;108(19):2400-6.
149. Endemann DH, Touyz RM, Iglarz M, Savoia C, Schiffrin EL. Eplerenone prevents salt-induced vascular remodeling and cardiac fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2004;43(6):1252-7.
150. Rajagopalan S, Duquaine D, King S, Pitt B, Patel P. Mineralocorticoid receptor antagonism in experimental atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(18):2212-6.
151. Virdis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, Schiffrin EL. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension*. 2002;40(4):504-10.
152. Sanz-Rosa D, Oubina MP, Cediel E, De las Heras N, Aragoncillo P, Balfagon G, et al. Eplerenone reduces oxidative stress and enhances eNOS in SHR: vascular functional and structural consequences. *Antioxidants & redox signaling*. 2005;7(9-10):1294-301.
153. Leyva-Lopez N, Gutierrez-Grijalva EP, Ambriz-Perez DL, Heredia JB. Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(6).

154. Van der Meide PH, Schellekens H. Cytokines and the immune response. *Biotherapy* (Dordrecht, Netherlands). 1996;8(3-4):243-9.
155. Masiha S, Sundstrom J, Lind L. Inflammatory markers are associated with left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in a population-based sample of elderly men and women. *Journal of human hypertension*. 2013;27(1):13-7.
156. Yang X, Chang Y, Wei W. Endothelial Dysfunction and Inflammation: Immunity in Rheumatoid Arthritis. *Mediators of inflammation*. 2016;2016:6813016.
157. Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *BioMed research international*. 2014;2014:406960.
158. Joffe HV, Adler GK. Effect of aldosterone and mineralocorticoid receptor blockade on vascular inflammation. *Heart failure reviews*. 2005;10(1):31-7.
159. Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P, Scherrer R, Delyani J, McMahon E. Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. *Endocrinology*. 2002;143(12):4828-36.
160. Zhang Y, Peng W, Ao X, Dai H, Yuan L, Huang X, et al. TAK-242, a Toll-Like Receptor 4 Antagonist, Protects against Aldosterone-Induced Cardiac and Renal Injury. *PloS one*. 2015;10(11):e0142456.
161. Sanz-Rosa D, Cediël E, de las Heras N, Miana M, Balfagon G, Lahera V, et al. Participation of aldosterone in the vascular inflammatory response of spontaneously hypertensive rats: role of the NFkappaB/IkappaB system. *Journal of hypertension*. 2005;23(6):1167-72.
162. Gilbert KC, Brown NJ. Aldosterone and inflammation. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2010;17(3):199-204.

- 163.Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K. The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *International journal of inflammation*. 2014;2014:689360.
- 164.Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress. *The American journal of pathology*. 2002;161(5):1773-81.
- 165.Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of lipid research*. 2007;48(4):751-62.
- 166.Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, Bringman TS, Henzel WJ, Jarrett JA, et al. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature*. 1984;312(5996):721-4.
- 167.Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, et al. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*. 1984;312(5996):724-9.
- 168.Warren JS, Ward PA, Johnson KJ. Tumor necrosis factor: a plurifunctional mediator of acute inflammation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 1988;1(3):242-7.
- 169.Steyers CM, 3rd, Miller FJ, Jr. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(7):11324-49.
- 170.Wang P, Ba ZF, Chaudry IH. Administration of tumor necrosis factor-alpha in vivo depresses endothelium-dependent relaxation. *The American journal of physiology*. 1994;266(6 Pt 2):H2535-41.

171. Chia S, Qadan M, Newton R, Ludlam CA, Fox KA, Newby DE. Intra-arterial tumor necrosis factor- α impairs endothelium-dependent vasodilatation and stimulates local tissue plasminogen activator release in humans. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23(4):695-701.
172. Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2000;102(9):1000-6.
173. Owczarek D, Cibor D, Mach T. Asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA), arginine, and 8-iso-prostaglandin F $_{2\alpha}$ (8-iso-PGF $_{2\alpha}$) level in patients with inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(1):52-7.
174. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF- β signaling in fibrosis. *Growth factors (Chur, Switzerland)*. 2011;29(5):196-202.
175. Giannandrea M, Parks WC. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Disease models & mechanisms*. 2014;7(2):193-203.
176. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology*. 2008;214(2):199-210.
177. Lan TH, Huang XQ, Tan HM. Vascular fibrosis in atherosclerosis. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2013;22(5):401-7.
178. Ruperez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation*. 2003;108(12):1499-505.

- 179.de las Heras N, Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Sanz-Rosa D, Miana M, Aragoncillo P, et al. Role of connective tissue growth factor in vascular and renal damage associated with hypertension in rats. Interactions with angiotensin II. Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS. 2006;7(4):192-200.
- 180.Kubota S, Takigawa M. Correction: Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions. Clinical science (London, England : 1979). 2015;129(7):674.
- 181.Oemar BS, Luscher TF. Connective tissue growth factor. Friend or foe? Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 1997;17(8):1483-9.
- 182.Lau LF, Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. Experimental cell research. 1999;248(1):44-57.
- 183.de las Heras N, Ruiz-Ortega M, Miana M, Ruperez M, Sanz-Rosa D, Aragoncillo P, et al. Interactions between aldosterone and connective tissue growth factor in vascular and renal damage in spontaneously hypertensive rats. Journal of hypertension. 2007;25(3):629-38.
- 184.Leask A, Abraham DJ. The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire. 2003;81(6):355-63.
- 185.Keil A, Blom IE, Goldschmeding R, Rupprecht HD. Nitric oxide down-regulates connective tissue growth factor in rat mesangial cells. Kidney international. 2002;62(2):401-11.
- 186.Rodriguez-Vita J, Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Sanchez-Lopez E, Plaza JJ, et al. Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. Circulation research. 2005;97(2):125-34.

- 187.Finckenberg P, Lassila M, Inkinen K, Pere AK, Krogerus L, Lindgren L, et al. Cyclosporine induces myocardial connective tissue growth factor in spontaneously hypertensive rats on high-sodium diet. *Transplantation*. 2001;71(7):951-8.
- 188.Fan WH, Pech M, Karnovsky MJ. Connective tissue growth factor (CTGF) stimulates vascular smooth muscle cell growth and migration in vitro. *European journal of cell biology*. 2000;79(12):915-23.
- 189.Parish LM, Gorman JH, 3rd, Kahn S, Plappert T, St John-Sutton MG, Bavaria JE, et al. Aortic size in acute type A dissection: implications for preventive ascending aortic replacement. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2009;35(6):941-5; discussion 5-6.
- 190.Frangogiannis NG. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiological reviews*. 2012;92(2):635-88.
- 191.Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of hypertension*. 2000;18(6):655-73.
- 192.Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular pharmacology*. 2015;71:40-56.
- 193.Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*. 2010;4(8):118-26.
- 194.Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*. 1993;49(3):481-93.
- 195.Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;893:13-8.

- 196.Stevens TL, Burnett JC, Jr., Kinoshita M, Matsuda Y, Redfield MM. A functional role for endogenous atrial natriuretic peptide in a canine model of early left ventricular dysfunction. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(3):1101-8.
- 197.Su JB. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World journal of cardiology*. 2015;7(11):719-41.
- 198.Rafikov R, Fonseca FV, Kumar S, Pardo D, Darragh C, Elms S, et al. eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *The Journal of endocrinology*. 2011;210(3):271-84.
- 199.Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*. 2012;5(1):9-19.
- 200.Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology : CB*. 2014;24(10):R453-62.
- 201.Sahoo S, Meijles DN, Pagano PJ. NADPH oxidases: key modulators in aging and age-related cardiovascular diseases? *Clinical science (London, England : 1979)*. 2016;130(5):317-35.
- 202.Takac I, Schroder K, Brandes RP. The Nox family of NADPH oxidases: friend or foe of the vascular system? *Current hypertension reports*. 2012;14(1):70-8.
- 203.Manea SA, Constantin A, Manda G, Sasson S, Manea A. Regulation of Nox enzymes expression in vascular pathophysiology: Focusing on transcription factors and epigenetic mechanisms. *Redox biology*. 2015;5:358-66.
- 204.Selemidis S, Sobey CG, Wingler K, Schmidt HH, Drummond GR. NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacology & therapeutics*. 2008;120(3):254-91.

- 205.Sardina JL, Lopez-Ruano G, Sanchez-Abarca LI, Perez-Simon JA, Gaztelumendi A, Trigueros C, et al. p22phox-dependent NADPH oxidase activity is required for megakaryocytic differentiation. *Cell death and differentiation*. 2010;17(12):1842-54.
- 206.Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(38):23317-21.
- 207.Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, et al. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circulation research*. 2002;90(11):1205-13.
- 208.Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2003;285(2):R277-97.
- 209.Manea A, Manea SA, Gafencu AV, Raicu M, Simionescu M. AP-1-dependent transcriptional regulation of NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells: role of p22phox subunit. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(5):878-85.
- 210.Park YM, Lim BH, Touyz RM, Park JB. Expression of NAD(P)H oxidase subunits and their contribution to cardiovascular damage in aldosterone/salt-induced hypertensive rat. *Journal of Korean medical science*. 2008;23(6):1039-45.
- 211.Birukov KG. Cyclic stretch, reactive oxygen species, and vascular remodeling. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(7):1651-67.

- 212.Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(8):1201-9.
- 213.Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(16):9220-5.
- 214.Forstermann U, Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *British journal of pharmacology*. 2011;164(2):213-23.
- 215.Fels J, Oberleithner H, Kusche-Vihrog K. Menage a trois: aldosterone, sodium and nitric oxide in vascular endothelium. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1802(12):1193-202.
- 216.Bauersachs J, Fraccarollo D. Endothelial NO synthase target of aldosterone. *Hypertension*. 2006;48(1):27-8.
- 217.Yang YM, Huang A, Kaley G, Sun D. eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2009;297(5):H1829-36.
- 218.Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal*. 2009;417(1):1-13.
- 219.Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of experimental biology*. 1998;201(Pt 8):1203-9.
- 220.Pacifici RE, Davies KJ. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology*. 1991;37(1-3):166-80.

- 221.Grune T, Davies KJ. The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Molecular aspects of medicine*. 2003;24(4-5):195-204.
- 222.Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;15(6):1583-606.
- 223.Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *The Journal of biological chemistry*. 1973;248(13):4793-6.
- 224.Kuhlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC biology*. 2015;13:89.
- 225.van der Laan M, Horvath SE, Pfanner N. Mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Current opinion in cell biology*. 2016;41:33-42.
- 226.Leaver CJ, Hack E, Forde BG. Protein synthesis by isolated plant mitochondria. *Methods in enzymology*. 1983;97:476-84.
- 227.Unseld M, Marienfeld JR, Brandt P, Brennicke A. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature genetics*. 1997;15(1):57-61.
- 228.Gray MW. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(9):a011403.
- 229.Srinivasan S, Guha M, Kashina A, Avadhani NG. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. *Biochimica et biophysica acta*. 2017.
- 230.Logan DC. The mitochondrial compartment. *Journal of experimental botany*. 2006;57(6):1225-43.

- 231.Wallace DC. The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: on the road to therapeutics and performance enhancement. *Gene*. 2005;354:169-80.
- 232.Brand MD, Orr AL, Perevoshchikova IV, Quinlan CL. The role of mitochondrial function and cellular bioenergetics in ageing and disease. *The British journal of dermatology*. 2013;169 Suppl 2:1-8.
- 233.Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology & medicine*. 2000;29(3-4):222-30.
- 234.Nicholls DG. Mitochondria and calcium signaling. *Cell calcium*. 2005;38(3-4):311-7.
- 235.Sebastian D, Palacin M, Zorzano A. Mitochondrial Dynamics: Coupling Mitochondrial Fitness with Healthy Aging. *Trends in molecular medicine*. 2017;23(3):201-15.
- 236.Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in biochemistry*. 2010;47:69-84.
- 237.Lahera V, de Las Heras N, Lopez-Farre A, Manucha W, Ferder L. Role of Mitochondrial Dysfunction in Hypertension and Obesity. *Current hypertension reports*. 2017;19(2):11.
- 238.Ren J, Pulakat L, Whaley-Connell A, Sowers JR. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2010;88(10):993-1001.
- 239.Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813(7):1269-78.

240. Yang ZF, Drumea K, Mott S, Wang J, Rosmarin AG. GABP transcription factor (nuclear respiratory factor 2) is required for mitochondrial biogenesis. *Molecular and cellular biology*. 2014;34(17):3194-201.
241. Satoh J, Kawana N, Yamamoto Y. Pathway Analysis of ChIP-Seq-Based NRF1 Target Genes Suggests a Logical Hypothesis of their Involvement in the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Gene regulation and systems biology*. 2013;7:139-52.
242. Biswas M, Chan JY. Role of Nrf1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond. *Toxicology and applied pharmacology*. 2010;244(1):16-20.
243. Yakubovskaya E, Guja KE, Eng ET, Choi WS, Mejia E, Beglov D, et al. Organization of the human mitochondrial transcription initiation complex. *Nucleic acids research*. 2014;42(6):4100-12.
244. Kukat C, Wurm CA, Spahr H, Falkenberg M, Larsson NG, Jakobs S. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(33):13534-9.
245. Bogenhagen DF. Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1819(9-10):914-20.
246. Bogenhagen DF, Rousseau D, Burke S. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(6):3665-75.
247. Shi Y, Dierckx A, Wanrooij PH, Wanrooij S, Larsson NG, Wilhelmsson LM, et al. Mammalian transcription factor A is a core component of the mitochondrial transcription machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(41):16510-5.

- 248.Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hultenby K, et al. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Human molecular genetics*. 2004;13(9):935-44.
- 249.Kaufman BA, Durisic N, Mativetsky JM, Costantino S, Hancock MA, Grutter P, et al. The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Molecular biology of the cell*. 2007;18(9):3225-36.
- 250.Ploumi C, Daskalaki I, Tavernarakis N. Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act. *The FEBS journal*. 2017;284(2):183-95.
- 251.Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(7):847-56.
- 252.Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998;92(6):829-39.
- 253.Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circulation research*. 2008;102(4):488-96.
- 254.Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*. 2005;434(7029):113-8.
- 255.Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal*. 2008;27(2):433-46.

- 256.Liu X, Weaver D, Shiriha O, Hajnoczky G. Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *The EMBO journal*. 2009;28(20):3074-89.
- 257.Caglinec M, Safiulina D, Liiv M, Liiv J, Choubey V, Wareski P, et al. Principles of the mitochondrial fusion and fission cycle in neurons. *Journal of cell science*. 2013;126(Pt 10):2187-97.
- 258.Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science (New York, NY)*. 2012;337(6098):1062-5.
- 259.Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(45):15927-32.
- 260.Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science (New York, NY)*. 2004;305(5685):858-62.
- 261.Hoppins S, Lackner L, Nunnari J. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annual review of biochemistry*. 2007;76:751-80.
- 262.Legros F, Lombes A, Frachon P, Rojo M. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Molecular biology of the cell*. 2002;13(12):4343-54.
- 263.Eura Y, Ishihara N, Yokota S, Mihara K. Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *Journal of biochemistry*. 2003;134(3):333-44.
- 264.Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of cell biology*. 2003;160(2):189-200.

- 265.Meeusen S, DeVay R, Block J, Cassidy-Stone A, Wayson S, McCaffery JM, et al. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell*. 2006;127(2):383-95.
- 266.Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Brichese L, Gas N, et al. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS letters*. 2002;523(1-3):171-6.
- 267.Akepati VR, Muller EC, Otto A, Strauss HM, Portwich M, Alexander C. Characterization of OPA1 isoforms isolated from mouse tissues. *Journal of neurochemistry*. 2008;106(1):372-83.
- 268.Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *The Journal of cell biology*. 2007;178(5):749-55.
- 269.Head B, Griparic L, Amiri M, Gandre-Babbe S, van der Bliek AM. Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *The Journal of cell biology*. 2009;187(7):959-66.
- 270.Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *The EMBO journal*. 2006;25(13):2966-77.
- 271.DeVay RM, Dominguez-Ramirez L, Lackner LL, Hoppins S, Stahlberg H, Nunnari J. Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *The Journal of cell biology*. 2009;186(6):793-803.
- 272.Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, et al. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*. 2006;126(1):177-89.

- 273.Yamaguchi R, Lartigue L, Perkins G, Scott RT, Dixit A, Kushnareva Y, et al. Opa1-mediated cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization. *Molecular cell*. 2008;31(4):557-69.
- 274.Duvezin-Caubet S, Jagasia R, Wagener J, Hofmann S, Trifunovic A, Hansson A, et al. Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(49):37972-9.
- 275.Baricault L, Segui B, Guegand L, Olichon A, Valette A, Larminat F, et al. OPA1 cleavage depends on decreased mitochondrial ATP level and bivalent metals. *Experimental cell research*. 2007;313(17):3800-8.
- 276.Guillery O, Malka F, Landes T, Guillou E, Blackstone C, Lombes A, et al. Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 2008;100(5):315-25.
- 277.Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Molecular biology of the cell*. 2001;12(8):2245-56.
- 278.Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN, van der Bliek AM. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *The Journal of cell biology*. 1998;143(2):351-8.
- 279.Bossy-Wetzel E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Current opinion in cell biology*. 2003;15(6):706-16.
- 280.Loson OC, Song Z, Chen H, Chan DC. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular biology of the cell*. 2013;24(5):659-67.

- 281.Yoon Y, Galloway CA, Jhun BS, Yu T. Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;14(3):439-57.
- 282.Gandre-Babbe S, van der Bliek AM. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Molecular biology of the cell*. 2008;19(6):2402-12.
- 283.Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(15):5409-20.
- 284.James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(38):36373-9.
- 285.Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*. 2010;221(1):3-12.
- 286.Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728-41.
- 287.Dorn GW, 2nd, Kitsis RN. The mitochondrial dynamism-mitophagy-cell death interactome: multiple roles performed by members of a mitochondrial molecular ensemble. *Circulation research*. 2015;116(1):167-82.
- 288.Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011;12(1):9-14.
- 289.Stotland A, Gottlieb RA. Mitochondrial quality control: Easy come, easy go. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1853(10 Pt B):2802-11.

- 290.Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(1):378-83.
- 291.Fedorowicz MA, de Vries-Schneider RL, Rub C, Becker D, Huang Y, Zhou C, et al. Cytosolic cleaved PINK1 represses Parkin translocation to mitochondria and mitophagy. *EMBO reports*. 2014;15(1):86-93.
- 292.Greene AW, Grenier K, Aguilera MA, Muise S, Farazifard R, Haque ME, et al. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO reports*. 2012;13(4):378-85.
- 293.Shirihai OS, Song M, Dorn GW, 2nd. How mitochondrial dynamism orchestrates mitophagy. *Circulation research*. 2015;116(11):1835-49.
- 294.Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(10):685-98.
- 295.Butow RA, Avadhani NG. Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Molecular cell*. 2004;14(1):1-15.
- 296.Yu E, Mercer J, Bennett M. Mitochondria in vascular disease. *Cardiovascular research*. 2012;95(2):173-82.
- 297.Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circulation research*. 2001;88(5):529-35.
- 298.Lopez-Armada MJ, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-Garcia C, Valcarcel-Ares MN. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. *Mitochondrion*. 2013;13(2):106-18.
- 299.Sebastian D, Hernandez-Alvarez MI, Segales J, Sorianello E, Munoz JP, Sala D, et al. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin

signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(14):5523-8.

300.Chen KH, Guo X, Ma D, Guo Y, Li Q, Yang D, et al. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nature cell biology*. 2004;6(9):872-83.

301.Manucha W, Ritchie B, Ferder L. Hypertension and insulin resistance: implications of mitochondrial dysfunction. *Current hypertension reports*. 2015;17(1):504.

302.Zhang X, Li ZL, Crane JA, Jordan KL, Pawar AS, Textor SC, et al. Valsartan regulates myocardial autophagy and mitochondrial turnover in experimental hypertension. *Hypertension*. 2014;64(1):87-93.

303.Tang X, Luo YX, Chen HZ, Liu DP. Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Frontiers in physiology*. 2014;5:175.

304.Davidson SM, Duchon MR. Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease. *Circulation research*. 2007;100(8):1128-41.

305.Zhu C, Huang S, Yuan Y, Ding G, Chen R, Liu B, et al. Mitochondrial dysfunction mediates aldosterone-induced podocyte damage: a therapeutic target of PPARgamma. *The American journal of pathology*. 2011;178(5):2020-31.

306.Guo Y, Deng X, Chen S, Yang L, Ni J, Wang R, et al. MicroRNA-30e Targets BNIP3L to Protect against Aldosterone-induced Podocyte Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction. *American journal of physiology Renal physiology*. 2016:ajprenal.00486.2016.

307.Landete JM. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2012;52(10):936-48.

- 308.Tangney CC, Rasmussen HE. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Current atherosclerosis reports*. 2013;15(5):324.
- 309.Khurana S, Venkataraman K, Hollingsworth A, Piche M, Tai TC. Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients*. 2013;5(10):3779-827.
- 310.Arranz S, Chiva-Blanch G, Valderas-Martinez P, Medina-Remon A, Lamuela-Raventos RM, Estruch R. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients*. 2012;4(7):759-81.
- 311.Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;81(1 Suppl):317s-25s.
- 312.Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet (London, England)*. 1992;339(8808):1523-6.
- 313.Quinones M, Miguel M, Aleixandre A. [The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease]. *Nutricion hospitalaria*. 2012;27(1):76-89.
- 314.Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010;2(12):1231-46.
- 315.Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2009;2(5):270-8.
- 316.Korkina LG, Afanas'ev IB. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif)*. 1997;38:151-63.
- 317.Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*. 2001;74(4):418-25.

- 318.Orallo F, Alvarez E, Camina M, Leiro JM, Gomez E, Fernandez P. The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Molecular pharmacology*. 2002;61(2):294-302.
- 319.Dreosti IE. Bioactive ingredients: antioxidants and polyphenols in tea. *Nutrition reviews*. 1996;54(11 Pt 2):S51-8.
- 320.Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*. 1998;56(11):317-33.
- 321.Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;81(1 Suppl):223s-9s.
- 322.Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of nutrition*. 2002;22:19-34.
- 323.Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(5):727-47.
- 324.Crozier A. Dietary phenolics, absorption, mammalian and microbial metabolism and colonic health. *Molecular nutrition & food research*. 2009;53 Suppl 1:S5-6.
- 325.Dixon RA, Xie DY, Sharma SB. Proanthocyanidins--a final frontier in flavonoid research? *The New phytologist*. 2005;165(1):9-28.
- 326.de la Iglesia R, Milagro FI, Campion J, Boque N, Martinez JA. Healthy properties of proanthocyanidins. *BioFactors (Oxford, England)*. 2010;36(3):159-68.
- 327.Blade C, Aragonés G, Arola-Arnal A, Muguerza B, Bravo FI, Salvado MJ, et al. Proanthocyanidins in health and disease. *BioFactors (Oxford, England)*. 2016;42(1):5-12.

- 328.Koga T, Moro K, Nakamori K, Yamakoshi J, Hosoyama H, Kataoka S, et al. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1999;47(5):1892-7.
- 329.Lee YA, Kim YJ, Cho EJ, Yokozawa T. Ameliorative effects of proanthocyanidin on oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007;55(23):9395-400.
- 330.Stoclet JC, Kleschyov A, Andriambeloson E, Diebolt M, Andriantsitohaina R. Endothelial NO release caused by red wine polyphenols. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 1999;50(4):535-40.
- 331.Fernandez-Iglesias A, Pajuelo D, Quesada H, Diaz S, Blade C, Arola L, et al. Grape seed proanthocyanidin extract improves the hepatic glutathione metabolism in obese Zucker rats. *Molecular nutrition & food research*. 2014;58(4):727-37.
- 332.Martinez-Micaelo N, Gonzalez-Abuin N, Ardevol A, Pinent M, Blay MT. Procyanidins and inflammation: molecular targets and health implications. *BioFactors (Oxford, England)*. 2012;38(4):257-65.
- 333.Vasileiou I, Katsargyris A, Theocharis S, Giaginis C. Current clinical status on the preventive effects of cranberry consumption against urinary tract infections. *Nutrition research (New York, NY)*. 2013;33(8):595-607.
- 334.Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, et al. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation research*. 2003;523-524:87-97.
- 335.McKay DL, Blumberg JB. Cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and cardiovascular disease risk factors. *Nutrition reviews*. 2007;65(11):490-502.

- 336.Wang X, Ouyang YY, Liu J, Zhao G. Flavonoid intake and risk of CVD: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *The British journal of nutrition*. 2014;111(1):1-11.
- 337.McCullough ML, Peterson JJ, Patel R, Jacques PF, Shah R, Dwyer JT. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. *The American journal of clinical nutrition*. 2012;95(2):454-64.
- 338.DalBo S, Moreira EG, Brandao FC, Horst H, Pizzolatti MG, Micke GA, et al. Mechanisms underlying the vasorelaxant effect induced by proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* in rat small resistance arteries. *Journal of pharmacological sciences*. 2008;106(2):234-41.
- 339.Sen CK, Bagchi D. Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract. *Molecular and cellular biochemistry*. 2001;216(1-2):1-7.
- 340.Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Keen CL, Fraga CG. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS letters*. 2003;555(3):597-600.
- 341.Pons Z, Guerrero L, Margalef M, Arola L, Arola-Arnal A, Muguerza B. Effect of low molecular grape seed proanthocyanidins on blood pressure and lipid homeostasis in cafeteria diet-fed rats. *Journal of physiology and biochemistry*. 2014;70(2):629-37.
- 342.Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *Journal of hypertension*. 2003;21(12):2281-6.
- 343.Fraga CG, Oteiza PI. Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free radical biology & medicine*. 2011;51(4):813-23.

344. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free radical biology & medicine*. 2004;36(7):838-49.
345. Martin-Fernandez B, de las Heras N, Valero-Munoz M, Ballesteros S, Yao YZ, Stanton PG, et al. Beneficial effects of proanthocyanidins in the cardiac alterations induced by aldosterone in rat heart through mineralocorticoid receptor blockade. *PloS one*. 2014;9(10):e111104.
346. Grieger F, Wolter F. [Importance of cuff-width in indirect blood pressure determination in the rat's tail]. *Acta biologica et medica Germanica*. 1971;26(3):637-41.
347. Maeso R, Rodrigo E, Munoz-Garcia R, Navarro-Cid J, Ruilope LM, Cachofeiro V, et al. Chronic treatment with losartan ameliorates vascular dysfunction induced by aging in spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*. 1998;16(5):665-72.
348. Sim MK, Radhakrishnan R. In vivo study of angiotensin II tachyphylaxis in freely moving normo- and hypertensive rats. *Pharmacology & toxicology*. 1994;74(4-5):223-7.
349. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-54.
350. Nahum LH. The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) clinical conditions with increased production of renin. *Connecticut medicine*. 1965;29(11):772-5 *passim*.
351. Chrissobolis S. Vascular Consequences of Aldosterone Excess and Mineralocorticoid Receptor Antagonism. *Current hypertension reviews*. 2017.
352. Schiffrin EL. Effects of aldosterone on the vasculature. *Hypertension*. 2006;47(3):312-8.

353. Park JB, Schiffrin EL. Cardiac and vascular fibrosis and hypertrophy in aldosterone-infused rats: role of endothelin-1. *American journal of hypertension*. 2002;15(2 Pt 1):164-9.
354. Benetos A, Lacolley P, Safar ME. Prevention of aortic fibrosis by spironolactone in spontaneously hypertensive rats. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1997;17(6):1152-6.
355. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension*. 1993;21(6 Pt 2):929-33.
356. Nishizaka MK, Zaman MA, Green SA, Renfro KY, Calhoun DA. Impaired endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in hypertensive subjects with hyperaldosteronism. *Circulation*. 2004;109(23):2857-61.
357. Blanco-Rivero J, Cachafeiro V, Lahera V, Aras-Lopez R, Marquez-Rodas I, Salaices M, et al. Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 2005;46(1):107-12.
358. Kasal DA, Barhoumi T, Li MW, Yamamoto N, Zdanovich E, Rehman A, et al. T regulatory lymphocytes prevent aldosterone-induced vascular injury. *Hypertension*. 2012;59(2):324-30.
359. Feldman RD, Gros R. Vascular effects of aldosterone: sorting out the receptors and the ligands. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2013;40(12):916-21.
360. Romagnì P, Rossi F, Guerrini L, Quirini C, Santiemma V. Aldosterone induces contraction of the resistance arteries in man. *Atherosclerosis*. 2003;166(2):345-9.
361. Schmidt BM, Montealegre A, Janson CP, Martin N, Stein-Kemmesies C, Scherhag A, et al. Short term cardiovascular effects of aldosterone in healthy male volunteers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(10):3528-33.

- 362.Schiffrin EL, Gutkowska J, Genest J. Effect of angiotensin II and deoxycorticosterone infusion on vascular angiotensin II receptors in rats. *The American journal of physiology*. 1984;246(4 Pt 2):H608-14.
- 363.Schiffrin EL, Franks DJ, Gutkowska J. Effect of aldosterone on vascular angiotensin II receptors in the rat. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1985;63(12):1522-7.
- 364.Batenburg WW, Jansen PM, van den Bogaerdt AJ, AH JD. Angiotensin II-aldosterone interaction in human coronary microarteries involves GPR30, EGFR, and endothelial NO synthase. *Cardiovascular research*. 2012;94(1):136-43.
- 365.Yamada M, Kushibiki M, Osanai T, Tomita H, Okumura K. Vasoconstrictor effect of aldosterone via angiotensin II type 1 (AT1) receptor: possible role of AT1 receptor dimerization. *Cardiovascular research*. 2008;79(1):169-78.
- 366.Hosseini S, Lee J, Sepulveda RT, Rohdewald P, Watson RR. A randomized, double-blind, placebo-controlled, prospective, 16 week crossover study to determine the role of Pycnogenol in modifying blood pressure in mildly hypertensive patients. *Nutrition Research*. 2001;21(9):1251-60.
- 367.Kwak CJ, Kubo E, Fujii K, Nishimura Y, Kobuchi S, Ohkita M, et al. Antihypertensive effect of French maritime pine bark extract (Flavangenol): possible involvement of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation. *Journal of hypertension*. 2009;27(1):92-101.
- 368.Huang LL, Pan C, Wang L, Ding L, Guo K, Wang HZ, et al. Protective effects of grape seed proanthocyanidins on cardiovascular remodeling in DOCA-salt hypertension rats. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2015;26(8):841-9.

- 369.Lan CZ, Ding L, Su YL, Guo K, Wang L, Kan HW, et al. Grape seed proanthocyanidins prevent DOCA-salt hypertension-induced renal injury and its mechanisms in rats. *Food & function*. 2015;6(7):2179-86.
- 370.Hugel HM, Jackson N, May B, Zhang AL, Xue CC. Polyphenol protection and treatment of hypertension. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2016;23(2):220-31.
- 371.Draijer R, de Graaf Y, Slettenaar M, de Groot E, Wright CI. Consumption of a polyphenol-rich grape-wine extract lowers ambulatory blood pressure in mildly hypertensive subjects. *Nutrients*. 2015;7(5):3138-53.
- 372.Enseleit F, Sudano I, Periat D, Winnik S, Wolfrum M, Flammer AJ, et al. Effects of Pycnogenol on endothelial function in patients with stable coronary artery disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled, cross-over study. *European heart journal*. 2012;33(13):1589-97.
- 373.Liu X, Qiu J, Zhao S, You B, Ji X, Wang Y, et al. Grape seed proanthocyanidin extract alleviates ouabain-induced vascular remodeling through regulation of endothelial function. *Molecular medicine reports*. 2012;6(5):949-54.
- 374.Hishikawa K, Oemar BS, Nakaki T. Static pressure regulates connective tissue growth factor expression in human mesangial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(20):16797-803.
- 375.Chaqour B, Goppelt-Struebe M. Mechanical regulation of the Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 proteins. *The FEBS journal*. 2006;273(16):3639-49.
- 376.Lipson KE, Wong C, Teng Y, Spong S. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis & tissue repair*. 2012;5(Suppl 1):S24.

- 377.Jaffe IZ, Mendelsohn ME. Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation research*. 2005;96(6):643-50.
- 378.Mazak I, Fiebeler A, Muller DN, Park JK, Shagdarsuren E, Lindschau C, et al. Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2004;109(22):2792-800.
- 379.Callera GE, Montezano AC, Yogi A, Tostes RC, He Y, Schiffrin EL, et al. c-Src-dependent nongenomic signaling responses to aldosterone are increased in vascular myocytes from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2005;46(4):1032-8.
- 380.Miyata K, Hitomi H, Guo P, Zhang GX, Kimura S, Kiyomoto H, et al. Possible involvement of Rho-kinase in aldosterone-induced vascular smooth muscle cell remodeling. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2008;31(7):1407-13.
- 381.Liang Y, Wang J, Gao H, Wang Q, Zhang J, Qiu J. Beneficial effects of grape seed proanthocyanidin extract on arterial remodeling in spontaneously hypertensive rats via protecting against oxidative stress. *Molecular medicine reports*. 2016;14(4):3711-8.
- 382.Liang Y, Gao H, Wang J, Wang Q, Zhao S, Zhang J, et al. Alleviative effect of grape seed proanthocyanidin extract on small artery vascular remodeling in spontaneous hypertensive rats via inhibition of collagen hyperplasia. *Molecular medicine reports*. 2017;15(5):2643-52.
- 383.Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic research in cardiology*. 2008;103(5):398-406.
- 384.Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical pharmacology*. 2009;78(6):539-52.

- 385.Savoia C, Sada L, Zezza L, Pucci L, Lauri FM, Befani A, et al. Vascular inflammation and endothelial dysfunction in experimental hypertension. *International journal of hypertension*. 2011;2011:281240.
- 386.Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EA, et al. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002;283(5):H1802-10.
- 387.Li WG, Zhang XY, Wu YJ, Tian X. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta pharmacologica Sinica*. 2001;22(12):1117-20.
- 388.Garbacki N, Kinet M, Nussgens B, Desmecht D, Damas J. Proanthocyanidins, from *Ribes nigrum* leaves, reduce endothelial adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1. *Journal of inflammation (London, England)*. 2005;2:9.
- 389.Zhang Y, Shi H, Wang W, Ke Z, Xu P, Zhong Z, et al. Antithrombotic effect of grape seed proanthocyanidins extract in a rat model of deep vein thrombosis. *Journal of vascular surgery*. 2011;53(3):743-53.
- 390.Iwashima F, Yoshimoto T, Minami I, Sakurada M, Hirono Y, Hirata Y. Aldosterone induces superoxide generation via Rac1 activation in endothelial cells. *Endocrinology*. 2008;149(3):1009-14.
- 391.Miyata K, Rahman M, Shokoji T, Nagai Y, Zhang GX, Sun GP, et al. Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(10):2906-12.
- 392.Bayorh MA, Rollins-Hairston A, Adiyiah J, Lyn D, Eatman D. Eplerenone suppresses aldosterone/ salt-induced expression of NOX-4. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2011;12(3):195-201.

- 393.Martin-Fernandez B, de las Heras N, Miana M, Ballesteros S, Delgado C, Song S, et al. Structural, functional, and molecular alterations produced by aldosterone plus salt in rat heart: association with enhanced serum and glucocorticoid-regulated kinase-1 expression. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2011;57(1):114-21.
- 394.Park YM, Park MY, Suh YL, Park JB. NAD(P)H oxidase inhibitor prevents blood pressure elevation and cardiovascular hypertrophy in aldosterone-infused rats. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;313(3):812-7.
- 395.Munzel T, Daiber A, Mulsch A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circulation research*. 2005;97(7):618-28.
- 396.Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(8):1551-7.
- 397.Thai HM, Do BQ, Tran TD, Gaballa MA, Goldman S. Aldosterone antagonism improves endothelial-dependent vasorelaxation in heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase production. *Journal of cardiac failure*. 2006;12(3):240-5.
- 398.Nagata D, Takahashi M, Sawai K, Tagami T, Usui T, Shimatsu A, et al. Molecular mechanism of the inhibitory effect of aldosterone on endothelial NO synthase activity. *Hypertension*. 2006;48(1):165-71.
- 399.Hashikabe Y, Suzuki K, Jojima T, Uchida K, Hattori Y. Aldosterone impairs vascular endothelial cell function. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2006;47(4):609-13.
- 400.Fraga CG, Martino VS, Ferraro GE, Coussio JD, Boveris A. Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence. *Biochemical pharmacology*. 1987;36(5):717-20.

- 401.Orozco TJ, Wang JF, Keen CL. Chronic consumption of a flavanol- and procyanidin-rich diet is associated with reduced levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat testes. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2003;14(2):104-10.
- 402.Alvarez E, Rodino-Janeiro BK, Jerez M, Uceda-Somoza R, Nunez MJ, Gonzalez-Juanatey JR. Procyanidins from grape pomace are suitable inhibitors of human endothelial NADPH oxidase. *Journal of cellular biochemistry*. 2012;113(4):1386-96.
- 403.Luzak B, Boncler M, Rywaniak J, Dudzinska D, Rozalski M, Krajewska U, et al. Extract from *Ribes nigrum* leaves in vitro activates nitric oxide synthase (eNOS) and increases CD39 expression in human endothelial cells. *Journal of physiology and biochemistry*. 2014;70(4):1007-19.
- 404.Edirisinghe I, Banaszewski K, Cappozzo J, McCarthy D, Burton-Freeman BM. Effect of black currant anthocyanins on the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in vitro in human endothelial cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(16):8616-24.
- 405.Ramirez-Sanchez I, Maya L, Ceballos G, Villarreal F. (-)-epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways. *Hypertension*. 2010;55(6):1398-405.
- 406.DalBo S, Goulart S, Horst H, Pizzolatti MG, Ribeiro-do-Valle RM. Activation of endothelial nitric oxide synthase by proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* (Euphorbiaceae): involvement of extracellular calcium influx in rat thoracic aorta. *Journal of pharmacological sciences*. 2008;107(2):181-9.
- 407.Anselm E, Chataigneau M, Ndiaye M, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. *Cardiovascular research*. 2007;73(2):404-13.

- 408.Ndiaye M, Chataigneau M, Lobysheva I, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(3):455-7.
- 409.Andriambeloson E, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1999;33(2):248-54.
- 410.Duarte J, Andriambeloson E, Diebolt M, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols stimulate superoxide anion production to promote calcium signaling and endothelial-dependent vasodilatation. *Physiological research*. 2004;53(6):595-602.
- 411.Kaufeld AM, Pertz HH, Kolodziej H. 2,3-cis-procyanidins elicit endothelium-dependent relaxation in porcine coronary arteries via activation of the PI3/Akt kinase signaling pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61(40):9609-16.
- 412.Artunc F, Lang F. Mineralocorticoid and SGK1-sensitive inflammation and tissue fibrosis. *Nephron Physiology*. 2014;128(1-2):35-9.
- 413.Artunc F, Amann K, Nasir O, Friedrich B, Sandulache D, Jahovic N, et al. Blunted DOCA/high salt induced albuminuria and renal tubulointerstitial damage in gene-targeted mice lacking SGK1. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2006;84(9):737-46.
- 414.Vallon V, Wyatt AW, Klingel K, Huang DY, Hussain A, Berchtold S, et al. SGK1-dependent cardiac CTGF formation and fibrosis following DOCA treatment. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2006;84(5):396-404.
- 415.Terada Y, Ueda S, Hamada K, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, et al. Aldosterone stimulates nuclear factor-kappa B activity and transcription of intercellular adhesion

molecule-1 and connective tissue growth factor in rat mesangial cells via serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase-1. *Clinical and experimental nephrology*. 2012;16(1):81-8.

416.Tai DJ, Su CC, Ma YL, Lee EH. SGK1 phosphorylation of IkappaB Kinase alpha and p300 Up-regulates NF-kappaB activity and increases N-Methyl-D-aspartate receptor NR2A and NR2B expression. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(7):4073-89.

417.Lang F, Bohmer C, Palmada M, Seeböhm G, Strutz-Seeböhm N, Vallon V. (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiological reviews*. 2006;86(4):1151-78.

418.BelAïba RS, Djordjevic T, Bonello S, Artunc F, Lang F, Hess J, et al. The serum- and glucocorticoid-inducible kinase Sgk-1 is involved in pulmonary vascular remodeling: role in redox-sensitive regulation of tissue factor by thrombin. *Circulation research*. 2006;98(6):828-36.

419.Ambrosius WT, Bloem LJ, Zhou L, Rebhun JF, Snyder PM, Wagner MA, et al. Genetic variants in the epithelial sodium channel in relation to aldosterone and potassium excretion and risk for hypertension. *Hypertension*. 1999;34(4 Pt 1):631-7.

420.Kusche-Vihrog K, Jeggle P, Oberleithner H. The role of ENaC in vascular endothelium. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2014;466(5):851-9.

421.Jeggle P, Callies C, Tarjus A, Fassot C, Fels J, Oberleithner H, et al. Epithelial sodium channel stiffens the vascular endothelium in vitro and in Liddle mice. *Hypertension*. 2013;61(5):1053-9.

422.Kusche-Vihrog K, Sobczak K, Bangel N, Wilhelmi M, Nechiporuk-Zloy V, Schwab A, et al. Aldosterone and amiloride alter ENaC abundance in vascular endothelium. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2008;455(5):849-57.

423. Perez FR, Venegas F, Gonzalez M, Andres S, Vallejos C, Riquelme G, et al. Endothelial epithelial sodium channel inhibition activates endothelial nitric oxide synthase via phosphoinositide 3-kinase/Akt in small-diameter mesenteric arteries. *Hypertension*. 2009;53(6):1000-7.
424. Staub O, Gautschi I, Ishikawa T, Breitschopf K, Ciechanover A, Schild L, et al. Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. *The EMBO journal*. 1997;16(21):6325-36.
425. Lu C, Pribanic S, Debonneville A, Jiang C, Rotin D. The PY motif of ENaC, mutated in Liddle syndrome, regulates channel internalization, sorting and mobilization from subapical pool. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2007;8(9):1246-64.
426. Wiemuth D, Ke Y, Rohlf M, McDonald FJ. Epithelial sodium channel (ENaC) is multi-ubiquitinated at the cell surface. *The Biochemical journal*. 2007;405(1):147-55.
427. Zhou R, Patel SV, Snyder PM. Nedd4-2 catalyzes ubiquitination and degradation of cell surface ENaC. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(28):20207-12.
428. Gilmore TD, Herscovitch M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene*. 2006;25(51):6887-99.
429. Leroy V, De Seigneux S, Agassiz V, Hasler U, Rafestin-Oblin ME, Vinciguerra M, et al. Aldosterone activates NF-kappaB in the collecting duct. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2009;20(1):131-44.
430. Nagaki K, Yamamura H, Shimada S, Saito T, Hisanaga S, Taoka M, et al. 14-3-3 Mediates phosphorylation-dependent inhibition of the interaction between the ubiquitin E3 ligase Nedd4-2 and epithelial Na⁺ channels. *Biochemistry*. 2006;45(21):6733-40.

- 431.Lopatina EV, Kipenko AV, Penniyaynen VA, Pasatetchkaia NA, Tsyrlina VA. [Remodeling of Cardiovascular System: Causes and Consequences]. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2016;47(2):45-61.
- 432.Rotmans JJ, Rabelink TJ. Antenatal excessive sodium intake induces adverse vascular remodelling in offspring. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2012;27(9):3379-81.
- 433.Sanders PW. Vascular consequences of dietary salt intake. *American journal of physiology Renal physiology*. 2009;297(2):F237-43.
- 434.Graudal NA, Hubeck-Graudal T, Jurgens G. Effects of low sodium diet versus high sodium diet on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterol, and triglyceride. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2017;4:Cd004022.
- 435.Jones DW. Dietary sodium and blood pressure. *Hypertension*. 2004;43(5):932-5.
- 436.Zhang D, Li S, Cruz P, Kone BC. Sirtuin 1 functionally and physically interacts with disruptor of telomeric silencing-1 to regulate alpha-ENaC transcription in collecting duct. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(31):20917-26.
- 437.Fan YY, Kohno M, Hitomi H, Kitada K, Fujisawa Y, Yatabe J, et al. Aldosterone/Mineralocorticoid receptor stimulation induces cellular senescence in the kidney. *Endocrinology*. 2011;152(2):680-8.
- 438.Valero-Munoz M, Martin-Fernandez B, Ballesteros S, Lahera V, de las Heras N. Carob pod insoluble fiber exerts anti-atherosclerotic effects in rabbits through sirtuin-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha. *The Journal of nutrition*. 2014;144(9):1378-84.

- 439.Zhao M, Yuan Y, Bai M, Ding G, Jia Z, Huang S, et al. PGC-1alpha overexpression protects against aldosterone-induced podocyte depletion: role of mitochondria. *Oncotarget*. 2016;7(11):12150-62.
- 440.Yuan Y, Huang S, Wang W, Wang Y, Zhang P, Zhu C, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha ameliorates mitochondrial dysfunction and protects podocytes from aldosterone-induced injury. *Kidney international*. 2012;82(7):771-89.
- 441.Yuan Y, Chen Y, Zhang P, Huang S, Zhu C, Ding G, et al. Mitochondrial dysfunction accounts for aldosterone-induced epithelial-to-mesenchymal transition of renal proximal tubular epithelial cells. *Free radical biology & medicine*. 2012;53(1):30-43.
- 442.Su M, Dhoopun AR, Yuan Y, Huang S, Zhu C, Ding G, et al. Mitochondrial dysfunction is an early event in aldosterone-induced podocyte injury. *American journal of physiology Renal physiology*. 2013;305(4):F520-31.
- 443.Eirin A, Lerman A, Lerman LO. Mitochondrial injury and dysfunction in hypertension-induced cardiac damage. *European heart journal*. 2014;35(46):3258-66.
- 444.Liu C, Yang Q, Hwang SJ, Sun F, Johnson AD, Shiriha OS, et al. Association of genetic variation in the mitochondrial genome with blood pressure and metabolic traits. *Hypertension*. 2012;60(4):949-56.
- 445.Oberkofler H, Holz B, Esterbauer H, Xie M, Iglseder B, Krempler F, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 gene locus: associations with hypertension in middle-aged men. *Hypertension*. 2003;41(2):368-72.
- 446.Rimbaud S, Ruiz M, Piquereau J, Mateo P, Fortin D, Veksler V, et al. Resveratrol improves survival, hemodynamics and energetics in a rat model of hypertension leading to heart failure. *PloS one*. 2011;6(10):e26391.

447. Walther T, Tschope C, Sterner-Kock A, Westermann D, Heringer-Walther S, Riad A, et al. Accelerated mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate transport improves hypertension-induced heart disease. *Circulation*. 2007;115(3):333-44.
448. Biala A, Tauriainen E, Siltanen A, Shi J, Merasto S, Louhelainen M, et al. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis and ameliorates Ang II-induced cardiac remodeling in transgenic rats harboring human renin and angiotensinogen genes. *Blood pressure*. 2010;19(3):196-205.
449. Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007;292(5):H2023-31.
450. Nishio Y, Kanazawa A, Nagai Y, Inagaki H, Kashiwagi A. Regulation and role of the mitochondrial transcription factor in the diabetic rat heart. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1011:78-85.
451. Nisoli E, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, Fiorani M, et al. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(47):16507-12.
452. Ceylan-Isik AF, Guo KK, Carlson EC, Privratsky JR, Liao SJ, Cai L, et al. Metallothionein abrogates GTP cyclohydrolase I inhibition-induced cardiac contractile and morphological defects: role of mitochondrial biogenesis. *Hypertension*. 2009;53(6):1023-31.
453. Miller MW, Knaub LA, Olivera-Fragoso LF, Keller AC, Balasubramaniam V, Watson PA, et al. Nitric oxide regulates vascular adaptive mitochondrial dynamics. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2013;304(12):H1624-33.

- 454.Nisoli E, Clementi E, Carruba MO, Moncada S. Defective mitochondrial biogenesis: a hallmark of the high cardiovascular risk in the metabolic syndrome? *Circulation research*. 2007;100(6):795-806.
- 455.Kim JA, Wei Y, Sowers JR. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circulation research*. 2008;102(4):401-14.
- 456.Mohar DS, Malik S. The Sirtuin System: The Holy Grail of Resveratrol? *Journal of clinical & experimental cardiology*. 2012;3(11).
- 457.Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003;425(6954):191-6.
- 458.Hasko G, Pacher P. Endothelial Nrf2 activation: a new target for resveratrol? *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;299(1):H10-2.
- 459.Cui X, Liu X, Feng H, Zhao S, Gao H. Grape seed proanthocyanidin extracts enhance endothelial nitric oxide synthase expression through 5'-AMP activated protein kinase/Sirtuin 1-Krupple like factor 2 pathway and modulate blood pressure in ouabain induced hypertensive rats. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2012;35(12):2192-7.
- 460.Bao L, Cai X, Dai X, Ding Y, Jiang Y, Li Y, et al. Grape seed proanthocyanidin extracts ameliorate podocyte injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in low-dose streptozotocin-and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats. *Food & function*. 2014;5(8):1872-80.
- 461.Casanova E, Baselga-Escudero L, Ribas-Latre A, Arola-Arnal A, Blade C, Arola L, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and proanthocyanidins improve postprandial metabolic flexibility in rat. *BioFactors (Oxford, England)*. 2014;40(1):146-56.

- 462.Davinelli S, Sapere N, Visentin M, Zella D, Scapagnini G. Enhancement of mitochondrial biogenesis with polyphenols: combined effects of resveratrol and equol in human endothelial cells. *Immunity & ageing* : I & A. 2013;10(1):28.
- 463.Gutierrez-Salmean G, Ortiz-Vilchis P, Vacaseydel CM, Garduno-Siciliano L, Chamorro-Cevallos G, Meaney E, et al. Effects of (-)-epicatechin on a diet-induced rat model of cardiometabolic risk factors. *European journal of pharmacology*. 2014;728:24-30.
- 464.Walters JW, Amos D, Ray K, Santanam N. Mitochondrial redox status as a target for cardiovascular disease. *Current opinion in pharmacology*. 2016;27:50-5.
- 465.Fang L, Moore XL, Gao XM, Dart AM, Lim YL, Du XJ. Down-regulation of mitofusin-2 expression in cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Life sciences*. 2007;80(23):2154-60.
- 466.Yu H, Guo Y, Mi L, Wang X, Li L, Gao W. Mitofusin 2 inhibits angiotensin II-induced myocardial hypertrophy. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2011;16(2):205-11.
- 467.Pennanen C, Parra V, Lopez-Crisosto C, Morales PE, Del Campo A, Gutierrez T, et al. Mitochondrial fission is required for cardiomyocyte hypertrophy mediated by a Ca^{2+} -calcineurin signaling pathway. *Journal of cell science*. 2014;127(Pt 12):2659-71.
- 468.Anand R, Wai T, Baker MJ, Kladt N, Schauss AC, Rugarli E, et al. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *The Journal of cell biology*. 2014;204(6):919-29.
- 469.Chen L, Gong Q, Stice JP, Knowlton AA. Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovascular research*. 2009;84(1):91-9.

- 470.Chen L, Liu T, Tran A, Lu X, Tomilov AA, Davies V, et al. OPA1 mutation and late-onset cardiomyopathy: mitochondrial dysfunction and mtDNA instability. *Journal of the American Heart Association*. 2012;1(5):e003012.
- 471.Jin HS, Sober S, Hong KW, Org E, Kim BY, Laan M, et al. Age-dependent association of the polymorphisms in the mitochondria-shaping gene, OPA1, with blood pressure and hypertension in Korean population. *American journal of hypertension*. 2011;24(10):1127-35.
- 472.Puddu P, Puddu GM, Cravero E, De Pascalis S, Muscari A. The putative role of mitochondrial dysfunction in hypertension. *Clinical and experimental hypertension* (New York, NY : 1993). 2007;29(7):427-34.
- 473.Wai T, Garcia-Prieto J, Baker MJ, Merkwirth C, Benit P, Rustin P, et al. Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. *Science* (New York, NY). 2015;350(6265):aad0116.
- 474.Zepeda R, Kuzmich J, Parra V, Troncoso R, Pennanen C, Riquelme JA, et al. Drp1 loss-of-function reduces cardiomyocyte oxygen dependence protecting the heart from ischemia-reperfusion injury. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2014;63(6):477-87.
- 475.Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2010;121(18):2012-22.
- 476.Wang JX, Jiao JQ, Li Q, Long B, Wang K, Liu JP, et al. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med*. 2011;17(1):71-8.
- 477.Disatnik MH, Ferreira JC, Campos JC, Gomes KS, Dourado PM, Qi X, et al. Acute inhibition of excessive mitochondrial fission after myocardial infarction prevents long-

term cardiac dysfunction. Journal of the American Heart Association. 2013;2(5):e000461.

478.Ong SB, Kalkhoran SB, Cabrera-Fuentes HA, Hausenloy DJ. Mitochondrial fusion and fission proteins as novel therapeutic targets for treating cardiovascular disease. European journal of pharmacology. 2015;763(Pt A):104-14.

479.Peng K, Tao Y, Zhang J, Wang J, Ye F, Dan G, et al. Resveratrol Regulates Mitochondrial Biogenesis and Fission/Fusion to Attenuate Rotenone-Induced Neurotoxicity. Oxidative medicine and cellular longevity. 2016;2016:6705621.

480.Eckert GP, Schiborr C, Hagl S, Abdel-Kader R, Muller WE, Rimbach G, et al. Curcumin prevents mitochondrial dysfunction in the brain of the senescence-accelerated mouse-prone 8. Neurochemistry international. 2013;62(5):595-602.

481.Ikeda Y, Sciarretta S, Nagarajan N, Rubattu S, Volpe M, Frati G, et al. New insights into the role of mitochondrial dynamics and autophagy during oxidative stress and aging in the heart. Oxidative medicine and cellular longevity. 2014;2014:210934.

482.Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. Archives of biochemistry and biophysics. 2007;462(2):245-53.

483.Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. Rejuvenation research. 2005;8(1):3-5.

484.Disatnik MH, Hwang S, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. New therapeutics to modulate mitochondrial dynamics and mitophagy in cardiac diseases. Journal of molecular medicine (Berlin, Germany). 2015;93(3):279-87.

- 485.Kageyama Y, Hoshijima M, Seo K, Bedja D, Sysa-Shah P, Andrabi SA, et al. Parkin-independent mitophagy requires Drp1 and maintains the integrity of mammalian heart and brain. *The EMBO journal*. 2014;33(23):2798-813.
- 486.Sureshbabu A, Bhandari V. Targeting mitochondrial dysfunction in lung diseases: emphasis on mitophagy. *Frontiers in physiology*. 2013;4:384.
- 487.Xie Z, Lau K, Eby B, Lozano P, He C, Pennington B, et al. Improvement of cardiac functions by chronic metformin treatment is associated with enhanced cardiac autophagy in diabetic OVE26 mice. *Diabetes*. 2011;60(6):1770-8.
- 488.Han Z, Cao J, Song D, Tian L, Chen K, Wang Y, et al. Autophagy is involved in the cardioprotection effect of remote limb ischemic postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury in normal mice, but not diabetic mice. *PloS one*. 2014;9(1):e86838.
- 489.Zhao Y, Zhang L, Qiao Y, Zhou X, Wu G, Wang L, et al. Heme oxygenase-1 prevents cardiac dysfunction in streptozotocin-diabetic mice by reducing inflammation, oxidative stress, apoptosis and enhancing autophagy. *PloS one*. 2013;8(9):e75927.
- 490.He C, Bassik MC, Moresi V, Sun K, Wei Y, Zou Z, et al. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature*. 2012;481(7382):511-5.
- 491.Sciarretta S, Zhai P, Shao D, Maejima Y, Robbins J, Volpe M, et al. Rheb is a critical regulator of autophagy during myocardial ischemia: pathophysiological implications in obesity and metabolic syndrome. *Circulation*. 2012;125(9):1134-46.
- 492.Guo R, Zhang Y, Turdi S, Ren J. Adiponectin knockout accentuates high fat diet-induced obesity and cardiac dysfunction: role of autophagy. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1832(8):1136-48.

- 493.Kobayashi S, Liang Q. Autophagy and mitophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1852(2):252-61.
- 494.Tan S, Wong E. Mitophagy Transcriptome: Mechanistic Insights into Polyphenol-Mediated Mitophagy. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;2017:9028435.
- 495.Pallauf K, Rimbach G. Autophagy, polyphenols and healthy ageing. *Ageing research reviews*. 2013;12(1):237-52.
- 496.Das S, Mitrovsky G, Vasanthi HR, Das DK. Antiaging properties of a grape-derived antioxidant are regulated by mitochondrial balance of fusion and fission leading to mitophagy triggered by a signaling network of Sirt1-Sirt3-Foxo3-PINK1-PARKIN. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;2014:345105.
- 497.Yu X, Xu Y, Zhang S, Sun J, Liu P, Xiao L, et al. Quercetin Attenuates Chronic Ethanol-Induced Hepatic Mitochondrial Damage through Enhanced Mitophagy. *Nutrients*. 2016;8(1).
- 498.Harrison DG, Gongora MC, Guzik TJ, Widder J. Oxidative stress and hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH*. 2007;1(1):30-44.
- 499.Harrison DG, Gongora MC. Oxidative stress and hypertension. *The Medical clinics of North America*. 2009;93(3):621-35.
- 500.Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(22):10045-8.
- 501.Ohashi M, Runge MS, Faraci FM, Heistad DD. MnSOD deficiency increases endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(10):2331-6.

- 502.Rodriguez-Iturbe B, Sepassi L, Quiroz Y, Ni Z, Wallace DC, Vaziri ND. Association of mitochondrial SOD deficiency with salt-sensitive hypertension and accelerated renal senescence. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 2007;102(1):255-60.
- 503.Dikalova AE, Bikineyeva AT, Budzyn K, Nazarewicz RR, McCann L, Lewis W, et al. Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circulation research*. 2010;107(1):106-16.
- 504.Silva MA, Bruder-Nascimento T, Cau SB, Lopes RA, Mestriner FL, Fais RS, et al. Spironolactone treatment attenuates vascular dysfunction in type 2 diabetic mice by decreasing oxidative stress and restoring NO/GC signaling. *Frontiers in physiology*. 2015;6:269.
- 505.Verástegui-Tena L.M HBA, Tolentino M, Barrera P.K, Perez-Lizaur A.B, Tejero M.E. Effect of polyphenol rich dark chocolate ingestion in SOD2 and IL-6 expression and plasma total antioxidant capacity. *The FASEB Journal*. 2012;26.
- 506.Ramirez-Sanchez I, Taub PR, Ciaraldi TP, Nogueira L, Coe T, Perkins G, et al. (-)-Epicatechin rich cocoa mediated modulation of oxidative stress regulators in skeletal muscle of heart failure and type 2 diabetes patients. *International journal of cardiology*. 2013;168(4):3982-90.